

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS “ÓMICAS” EN LA BÚSQUEDA DE GENES IMPLICADOS EN PATOLOGÍAS ALÉRGICAS ASOCIADAS A LA INFECCIÓN POR *Anisakis simplex* s.l.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Pamela Julie Campioli Colabufalo

Directoras

Maria Jesús Perteguer Prieto
Teresa Gárate Ormaechea

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS “ÓMICAS” EN LA BÚSQUEDA DE GENES IMPLICADOS EN PATOLOGÍAS ALÉRGICAS ASOCIADAS A LA INFECCIÓN POR *Anisakis simplex* s.l.

Memoria presentada por
PAMELA JULIE CAMPIOLI COLABUFALO

para optar al grado de Doctor en Bioquímica,
Biología Molecular y Biomedicina

Trabajo realizado en el Laboratorio de Diagnóstico y Referencia de Enfermedades
Parasitarias del Centro Nacional de Microbiología - Instituto de Salud Carlos III bajo
la dirección de la Dra. Maria Jesús Perteguer Prieto y Dra. Teresa Gárate
Ormaechea



Madrid, 2017

Dra. Maria Jesús Perteguer Prieto, Científica titular y **Dra. Teresa Gárate Ormaechea**, Jefa de Servicio, miembros del Laboratorio de Diagnóstico y Referencia de Enfermedades Parasitarias del Centro Nacional de Microbiología - Instituto de Salud Carlos III,

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada **APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS "ÓMICAS" EN LA BÚSQUEDA DE GENES IMPLICADOS EN PATOLOGÍAS ALÉRGICAS ASOCIADAS A LA INFECCIÓN POR *Anisakis simplex* s.l.** ha sido realizada bajo su dirección en el Laboratorio de Diagnóstico y Referencia de Enfermedades Parasitarias del Centro Nacional de Microbiología - Instituto de Salud Carlos III, por la Licenciada Pamela Julie Campioli Colabufalo, y autorizan su presentación para ser calificada como Tesis Doctoral.

Madrid, 18 de Abril de 2017

Fdo.: Dra. Maria Jesús Perteguer Prieto

Fdo.: Dra. Teresa Gárate Ormaechea

El presente trabajo de tesis doctoral fue financiado por el proyecto de investigación “RD12/0018/0011” de la Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET) y “PI14CIII/00076: Diagnóstico serológico diferencial de helmintiasis asociadas a eosinofilia: desarrollo de ensayos multianalítico (xMAP) con antígenos recombinantes de especies de interés clínico” del Instituto de Salud Carlos III - Acción Estratégica de Salud Intramural (ISCIII-AESI)

*A mis padres, Vanessa
y Luis Arturo*

Agradecimientos

Primeramente a Dios, por sobre todas las cosas, acompañarme en los momentos difíciles, por las buenas experiencias que me ha regalado, por guiarme continuamente en las decisiones de la vida y haberme puesto en el camino correcto y rodeada de las personas adecuadas a lo largo de esta etapa.

A mis directoras de tesis, la Dra. Maria Jesús Perteguer, por los consejos invaluables y los aprendizajes obtenidos durante estos años de trabajo así como por el tiempo dedicado en mi formación profesional y personal, y a la Dra. Teresa Gárate, por abrirme las puertas del equipo de investigación y hacerme sentir parte del mismo. Gracias, a las dos, en esta última etapa por la dedicación absoluta hacia mí y este trabajo; les estaré eternamente agradecida.

A la Dra. Elizabeth Ferrer, por haberme dado el privilegio de ser su alumna y de adentrarme en el apasionante mundo de la investigación. Gracias por confiar en mí, por ser más que una profesora y ayudarme a encontrar oportunidades para mejorar mi carrera profesional. También por la inestimable ayuda y el apoyo cercano en un momento difícil de mi vida. Sin su ayuda sé que no hubiese podido llegar hasta donde he llegado.

A Luci por ser la otra hermana que me ha regalado la vida; porque hemos vivido toda esta etapa juntas. Gracias por la compañía y por ser esa familia que tanto valoras cuando estas lejos de casa, también por todas las aventuras vividas durante nuestra amistad y por tu optimismo que siempre está dispuesto a dar ánimos y aliento.

A las chicas del laboratorio porque me han enseñado que no necesitamos llevar la misma sangre para ser familia. A Felisa, por ser como una segunda madre, por alegrarme en las mañanas y estar siempre dispuesta a colaborar. A Juli por su inmensa ayuda y apoyo continuo, especialmente durante la última etapa de este proyecto; estaré siempre agradecida. A Silvia gracias por la compañía cercana, por tu generosidad y la ayuda desinteresada durante este trabajo. A Ana y Julia por escucharme, aconsejarme y haber compartido incontables horas de arduo trabajo. A Alicia gracias por todo el tiempo compartido y por tu valiosa ayuda en la última etapa de este trabajo. Gracias a todas; no he podido tener mayor suerte de haber encontrado un mejor equipo de trabajo.

A Eugenia y Carolina por acogerme en mis primeros pasos en el laboratorio, siempre estaré agradecida por ayudarme en el proceso de adaptación, su apoyo y cariño más allá del trabajo, incluyendo las meriendas que alegran el alma.

Al Dr. Javier Moreno por el apoyo para el inicio de esta investigación.

Al Dr. Paulino Gómez Puertas y a todo el equipo que conforma la empresa *Biomol Informatics* (Parque Científico de Madrid, Universidad Autónoma) por la colaboración imprescindible durante la tesis.

A la Dra. Isabel Cuesta y resto de miembros de la Unidad de Bioinformática del Centro Nacional de Microbiología (CNM-ISCIII) por su grandiosa ayuda durante este trabajo.

A la Dra. Carmen Cuéllar y su equipo de investigación del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la UCM y al Dr. Álvaro Dashner del Hospital Universitario de la Princesa por su contribución en los ensayos proteómicos.

Finalmente, a mis padres quienes me han apoyado en todas las decisiones de mi vida y enseñado que las cosas se logran con esfuerzo y dedicación; así como con su ejemplo, me enseñaron a vivir y querer a un país donde no he nacido, pero que lo siento como mío y estaré siempre agradecida. A mi hermana por ser siempre ese ejemplo diario de valentía y esfuerzo, gracias por tu compañía y consejos en momentos trascendentales de mi vida. A mi esposo, amigo y compañero de vida, Luis Arturo, por su comprensión, apoyo incondicional y paciencia infinita; gracias por no dejarme caer. A mis suegros, por animarme y apoyarme como a otra hija más. Al resto de mi familia política gracias por su interés y aliento desde la distancia.

Gracias a todos los que han contribuido de cualquier manera en esta tesis.

Índice

Índice	I
Índice de Figuras	VII
Índice de Tablas	IX
Abreviaturas	XI
Resumen	XV
Summary	XIX
INTRODUCCIÓN	1
1. Anisakidosis: clasificación taxonómica de los agentes causales y transmisión al hombre	3
1.1 Riesgo de transmisión en España	6
2. Patología y sintomatología	7
2.1 Formas clínicas de la anisakiosis	8
2.1.1 Anisakiosis gástrica	8
2.1.2 Anisakiosis gastroalérgica	9
2.1.3 Anisakiosis intestinal	10
2.1.4 Anisakiosis extragastrointestinal	11
2.1.5 Otras formas clínicas asociadas a la infección por <i>Anisakis</i>	11
2.1.5.1 Urticaria crónica asociada a sensibilización con <i>Anisakis</i> ...	11
2.1.5.2 Otras formas clínicas	11
2.2 Anisakiosis y cáncer	12
3. Diagnóstico inmunológico de la anisakiosis.....	13
3.1 Diagnóstico inmunológico <i>in vivo</i>	13
3.1.1 Pruebas cutáneas <i>in vivo</i> : <i>Skin Prick Test</i> (SPT).....	13
3.2 Diagnóstico inmunológico <i>in vitro</i>	14
3.2.1 Test de activación de basófilos (TAB)	14
3.2.2 Test de liberación de histamina	14
3.2.3 RAST y FEIA	15
3.2.4 Inmunotransferencia	15
3.2.5 ELISA	16
3.2.6 Microarrays	17
4. Alergenos descritos en <i>A. simplex</i> s.l.....	17
4.1 Ani s 1	19
4.2 Ani s 2	21

4.3	Ani s 3	22
4.4	Ani s 4	22
4.5	Ani s 5	23
4.6	Ani s 6	24
4.7	Ani s 7	24
4.8	Ani s 8	26
4.9	Ani s 9	26
4.10	Ani s 10	27
4.11	Ani s 11	28
4.12	Ani s 12	28
4.13	Ani s 13	29
4.14	Ani s 14	29
5.	Otros posibles nuevos alergen ^{os} de <i>A. simplex</i> s.l.....	30
5.1	Identificados mediante técnicas de proteómica.....	30
5.2	Identificados por otras aproximaciones tecnológicas: RAST, cribado de genotecas, etc.	31
6.	Genoma y transcriptoma de <i>A. simplex</i> s.l.....	32
OBJETIVOS	33
Objetivo general	35
Objetivos específicos	35
MATERIAL Y MÉTODOS	37
1.	Obtención de larvas y antígenos de <i>A. simplex</i> s.l.....	39
1.1	Larvas 3	39
1.2	Antígenos somáticos	39
1.3	Antígenos de excreción secreción (ES).....	39
2.	Sueros	40
2.1	Sueros de patologías alérgicas relacionadas con <i>A. simplex</i> s.l.	40
3.	Síntesis de librerías de ADNc de <i>A. simplex</i> s.l.	41
3.1	Síntesis de librerías estándar de ADNc	41
3.2	Síntesis de librerías normalizadas de ADNc (ADNc-N)	41
4.	Secuenciación masiva	41
5.	Ensamblaje “de novo” (E1) y anotación del transcriptoma de <i>A. simplex</i> s.l.	42
6.	Ensamblaje “de novo” guiado por referencia (E2) y anotación del transcriptoma <i>made in house</i> (MH) de <i>A. simplex</i> s.l.....	43
7.	Predicción de proteínas de ES y proteínas potencialmente alergénicas en el transcriptoma MH	44
7.1	Predicción de proteínas de ES.....	44

7.2 Predicción de proteínas potencialmente alergénicas	44
8. Clonación de los genes que expresan los antígenos de interés en vectores de mantenimiento	47
9. Valoración de la concentración de ADN	48
10. Secuenciación de ácidos nucleicos	49
11. Subclonación de genes que expresan antígenos de interés en vectores de expresión	49
12. Expresión proteica de los genes de interés para la obtención de los antígenos recombinantes	49
13. Purificación de los antígenos recombinantes mediante cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes.....	50
14. Determinación de la concentración proteica	51
15. Electroforesis unidimensional con geles de SDS-PAGE	51
16. Electroforesis bidimensional con geles de SDS-PAGE	52
17. Estudios de Proteómica	52
17.1 Digestión con tripsina en gel	53
17.2 Aplicación en Placa de MALDI	53
17.3 Adquisición de huella peptídica (espectro MS) y de espectros de fragmentación de péptidos (MS/MS)	53
17.4 Identificación por huella peptídica combinada con MS/MS.....	54
18. <i>Western blotting</i>	54
19. Sistema de diálisis progresiva	55
20. Programas para el análisis bioinformático	56
20.1 Secuencias	56
20.2 Proteínas	56
20.3 Alergenos	56
20.4 Búsqueda de posibles epitopos IgE/IgG en los nuevos alergen descritos	57
RESULTADOS	59
1. Búsqueda de alergen de <i>A. simplex</i> s.l. mediante análisis “in silico”	61
1.1 Construcción y ensamblado del transcriptoma MH de <i>A. simplex</i> s.l.	61
1.2 Predicción de regiones con secuencias de ADN codificante (CDS)	63
1.3 Anotación funcional de proteínas	63
1.4 Predicción de proteínas de ES	65
1.5 Predicción de proteínas potencialmente alergénicas	66
2. Búsqueda de alergen de <i>A. simplex</i> s.l. mediante análisis proteómico	74

2.1 Evaluación de los patrones de inmunorreconocimiento de los productos de ES de <i>A. simplex</i> s.l., por parte de pacientes con patologías alérgicas relacionadas con la infección por <i>A. simplex</i> s.l.	74
2.2. Selección de <i>spots</i> de los diferentes grupos e identificación de los alergenos correspondientes	76
2.3. Comparación de los genes de los nuevos alergenos descritos con los disponibles en las bases de datos públicas para las especies del complejo <i>A. simplex</i> s.l.	84
2.4. Clonación de nuevos alergenos de <i>A. simplex</i> s.l.	86
2.4.1 Amplificación y clonación de genes correspondientes a los alergenos identificados mediante <i>western blotting</i> bidimensional	86
2.4.2 Obtención de las proteínas recombinantes VA1 y VA2	90
3. Caracterización molecular de los genes de los alergenos Ani s 7 y Ani s 14	92
3.1 Alergeno Ani s 7	92
3.1.1 Búsqueda de transcritos relacionados con el alergenno Ani s 7	92
3.1.2 Comparación del gen teórico obtenido (CUFF) con base de datos públicas	96
3.1.2.1 Base de datos de secuencias genómicas de <i>A. simplex</i> s.l. de Sanger	96
3.1.2.2 Base de datos publicado de transcriptoma de <i>A. simplex</i> s.s y <i>A. pegreffii</i>	98
3.1.3 Verificación del gen Ani s 7 mediante clonación	99
3.1.3.1 Confirmación de la secuencia mediante amplificación de fragmentos del gen Ani s 7 mediante RACE-PCR y PCR convencional ...	99
3.1.3.2 Clonación de diferentes fragmentos que conforman el extremo 5' de Ani s 7	100
3.1.3.2.1 Fragmento D1R1	100
3.1.3.2.2 Fragmento D2R2	102
3.1.3.3 Clonación del extremo 3' de Ani s 7	103
3.1.4 Identificación de parálogos del alergenno Ani s 7	109
3.1.4.1 Parálogo P7-1	110
3.1.4.2 Parálogo P7-2	110
3.1.4.3 Parálogo P7-3	111
3.2 Alergeno Ani s 14	113
DISCUSIÓN	117
1. Búsqueda de alergenno de <i>A. simplex</i> s.l. mediante análisis “in silico”	119
2. Búsqueda de alergenno de <i>A. simplex</i> s.l. mediante análisis proteómicos	133

3. Caracterización molecular de los genes de los alergen ^{os} Ani s 7 y Ani s 14	142
3.1 Alergeno Ani s 7	142
3.2 Parálogos del Ani s 7.....	146
3.3 Alergeno Ani s 14	146
CONCLUSIONES	149
BIBLIOGRAFÍA	153
Anexo I	181
Anexo II	184
Glosario de términos	185

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de flujo de la generación y análisis de datos del transcriptoma MH de <i>A. simplex</i> s.l.	45
Figura 2. Diagrama de flujo del análisis de los datos del transcriptoma MH de <i>A. simplex</i> s.l.....	46
Figura 3. Resultados obtenidos en el ensamblaje del CL1Contig2545.....	61
Figura 4. Distribución de similitud de las secuencias.....	62
Figura 5. Distribución de especies con respecto a <i>A. simplex</i>	63
Figura 6. Resultados de anotaciones mediante <i>Blast2GO</i>	64
Figura 7. Resultados obtenidos con <i>Annex</i>	65
Figura 8. Predicción de los componentes celulares correspondientes a proteínas de ES predichas por <i>Blast2GO</i>	66
Figura 9. Diagrama de Venn para CDS similares a antígenos de humanos conocidos y predichos como proteínas de ES	66
Figura 10. Predicción de las funciones moleculares correspondientes a proteínas de ES predichas por <i>Blast2GO</i>	67
Figura 11. Porcentajes de identidad frente a proteínas de ES de nematodos y humanos, de los candidatos alérgicos de <i>A. simplex</i> correspondiente a proteínas de ES predichos a través de las bases de datos <i>Allermatch</i> , <i>FARRP</i> y <i>Allergome</i>	67
Figura 12. Áreas de reactividad IgE anti – <i>A. simplex</i> s.l. de los grupos sindrómicos estudiados	75
Figura 13. <i>Spots</i> seleccionados en cada área de reactividad IgE anti - <i>A. simplex</i> s.l. de los grupos sindrómicos estudiados	77
Figura 14. Amplificación de los genes de nuevos alérgenos seleccionados mediante <i>western blotting</i> bidimensional	87
Figura 15. Clones positivos obtenidos a través de PCR de colonias	88
Figura 16. Secuencia nucleotídica y aminoacídica del gen VA1	90
Figura 17. Secuencia nucleotídica y aminoacídica del gen VA2	90
Figura 18. Expresión y purificación de la proteína recombinante VA1	91
Figura 19. Expresión y purificación de la proteína recombinante VA2	91
Figura 20. Alineamiento de la secuencia CUFF.5600.1, obtenida de la base de datos MH-E2 con la secuencia descrita de Ani s 7 (ABL77410.1)	95
Figura 21. Alineamiento de la secuencia consenso CUFF.5600.1 y su homóloga en el genoma de Sanger (ASIM_0001402501)	97
Figura 22. Alineamiento de la secuencia CUFF.5600.1 (base de datos MH-E2), ASIM_0001402501 (genoma de Sanger) y Unigene11525_AS1A (Baird <i>et al.</i> , 2016)	98
Figura 23. Amplificación de diferentes fragmentos correspondiente al gen de Ani s 7.....	100
Figura 24. PCR de colonias obtenidas con los productos de amplificación empleando los cebadores D1 y R1	101

Figura 25. Alineamiento de las secuencias correspondientes al fragmento clonado D1R1 (850 nt) con la secuencia ASIM_0001402501 (Sanger)	101
Figura 26. Alineamiento de las secuencias correspondientes al fragmento clonado D1R1 (1.273 nt) con la secuencia ASIM_0001402501 (Sanger)	102
Figura 27. PCR de colonias obtenidas con el producto de amplificación derivado del empleo de los cebadores D2 y R2	102
Figura 28. Alineamiento de las secuencias correspondientes al fragmento clonado D2R2 con la secuencia ASIM_0001402501 (Sanger)	103
Figura 29. PCR de colonias de los diferentes fragmentos que componen al extremo 3' de Ani s 7	104
Figura 30. Alineamiento de las secuencias correspondientes al fragmento clonado D2R2 con la secuencia ASIM_0001402501 (Sanger)	104
Figura 31. Secuencia correspondiente al gen del alergeno Ani s 7 de 1.437 aa	105
Figura 32. Secuencia correspondiente al gen del alergeno Ani s 7 de 1.578 aa	105
Figura 33. Alineamiento de las secuencias de los genes de Ani s 7	106
Figura 34. Secuencia correspondiente a la proteína P7-1	110
Figura 35. Alineamiento de la secuencia de P7-1 con las obtenidas en la base de datos de Sanger	110
Figura 36. Secuencia correspondiente a la proteína P7-2	111
Figura 37. Alineamiento de la secuencia de P7-2 con la obtenida en la base de datos de Sanger	111
Figura 38. Secuencia correspondiente a la proteína P7-3	112
Figura 39. Alineamiento de la secuencia de P7-3 con la obtenida en la base de datos de Sanger	112
Figura 40. Secuencia correspondiente al gen que expresa el alergeno Ani s 14	114

Índice de tablas

Tabla 1. Características moleculares principales de los alergenios descritos en <i>A. simplex</i> s.l.	17
Tabla 2. Programas informáticos empleados para el ensamblaje y anotación de los genes del transcriptoma de <i>A. simplex</i> s.s.	43
Tabla 3. Genes amplificados mediante PCR convencional en el presente trabajo. Secuencia y características de cebadores (directo y reverso)	47
Tabla 4. Genes amplificados mediante PCR <i>touchdown</i> en el presente trabajo. Secuencia y características de cebadores (directo y reverso)	48
Tabla 5. Nombre de la molécula (genes que expresan los antígenos de interés), secuencia y características de cebadores utilizados en la subclonación, temperatura de hibridación y vector de clonación	49
Tabla 6. Condiciones utilizadas en <i>western blotting</i> para verificar los procesos de purificación y diagnóstico	55
Tabla 7. Resumen de bases de datos y herramientas bioinformáticas utilizadas para el análisis de secuencias	57
Tabla 8. Alergenios de <i>A. simplex</i> s.l. obtenidos tras la comparación de las secuencias de los dos ensamblados del transcriptoma MH obtenidos en el presente trabajo y la información en las bases de datos públicas	68
Tabla 9. Secuencia de los alergenios obtenidos tras la comparación con las secuencias presentes en las tres bases de datos	70
Tabla 10. Familia de proteínas de los alergenios predichos	74
Tabla 11. Proteínas identificadas mediante <i>matching</i> de péptidos a partir de la base de datos MH-E2, mediante el algoritmo MASCOT	78
Tabla 12. Proteínas identificadas mediante <i>matching</i> de péptidos a partir de la base de datos NCBI, mediante el algoritmo MASCOT	80
Tabla 13. Relación entre alergenios identificados experimentalmente y áreas de reconocimiento específicas	81
Tabla 14. Características de alergenios de <i>A. simplex</i> s.l. identificados experimentalmente	82
Tabla 15. Secuencias aminoacídicas de los alergenios de <i>A. simplex</i> s.l. identificados experimentalmente	83
Tabla 16. Variaciones en las secuencias de los nuevos alergenios en las diferentes especies estudiadas de <i>A. simplex</i> s.l.	85
Tabla 17. Características y secuencia aminoacídica de los clones recombinantes correspondiente a los alergenios identificados mediante <i>western blotting</i> bidimensional	89
Tabla 18. Tránscrios con la misma estructura y secuencia que el alergenio Ani s 7 obtenidos de las bases de datos MH-E1 y MH-E2	92
Tabla 19. Secuencias de tránscrios correspondientes a Ani s 7 obtenidos de las bases de datos MH-E1 y MH-E2	93

Tabla 20. Fragmentos obtenidos de la amplificación del gen de Ani s 7 utilizando diferentes combinaciones de los cebadores	99
Tabla 21. Diferencias entre Ani s 7 de <i>A. simplex</i> s.s y <i>A. pegreffii</i>	107
Tabla 22. Diferencias aminoacídicas en los clones de Ani s 7	107
Tabla 23. Posibles sitios de unión al AcM UA3 en Ani s 7	108
Tabla 24. Número de posibles epitopos de unión al AcM UA3 en Ani s 7	109
Tabla 25. Genes parálogos de Ani s 7	109
Tabla 26. Secuencias correspondientes al gen que expresa el alergeno principal Ani s 14, obtenidas de diferentes bases de datos	113
Tabla 27. Diferencias aminoacídicas en Ani s 14 de distintas especies de <i>A. simplex</i> .	114
Tabla 28. Posibles epitopos reconocidos por el anticuerpo UA3 encontrados en Ani s 14	115
Tabla 29. Repeticiones del epitopo de unión al AcM UA3 en Ani s 14	115

Abreviaturas

- **2D:** bidimensional
- **aa:** aminoácidos
- **AcM:** anticuerpo monoclonal
- **ADN:** ácido desoxirribonucleico
- **ADNc:** ácido desoxirribonucleico complementario
- **ADNm:** ácido desoxirribonucleico mitocondrial
- **ADNr:** ácido desoxirribonucleico ribosomal
- **Ag:** antígeno
- **AGA:** anisakiosis gastroalérgica
- **anti-Ani s 1:** anticuerpos frente a antígeno Ani s 1
- **anti-Ani s 5:** anticuerpos frente a antígeno Ani s 5
- **AP1:** cebador del adaptador 1 (cebador universal; del inglés, *Adaptor Primer 1*)
- **ARN:** ácido ribonucleico
- **ARNm:** ácido ribonucleico mensajero
- **ARN-poliA:** ácido ribonucleico mensajero con cola de poliA.
- **BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool
- **CAI:** Centro de Apoyo a la Investigación
- **CDR:** diagnósticos resueltos por componentes
- **CEP:** contraelectroforesis
- **CIE:** inmunolectroforesis cruzada
- **CNM:** Centro Nacional de Microbiología
- **CRIE:** radioinmunolectroforesis cruzada
- **dNTPs:** 2'-desoxirribonucleósidos-5'-trifosfato
- **D:** anisakiosis digestiva
- **DAB:** 3,3'-diaminobencidina
- **DO_{260nm}:** densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm
- **DTT:** ditiotreitól
- **ELISA:** ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
- **ES:** productos de excreción secreción
- **FEIA:** inmunoensayo fluoroenzimático
- **g:** gramo
- **g/l:** gramos por litro
- **h:** hora
- **HLA:** antígeno leucocitario humano (del inglés, *Human leukocyte antigen*)
- **IEF:** isoelectroenfoque
- **IgA:** inmunoglobulina A

- **IgE:** inmunoglobulina E
- **IgG:** inmunoglobulina G
- **IPTG:** isopropilo- β -D-tiogalactósido.
- **ISCI:** Instituto de Salud Carlos III
- **kDa:** kilodalton
- **kU/l:** kilo unidades por litro
- **kV:** kilovoltio
- **KVh:** kilovoltios hora
- **LB:** Luria-Bertani
- **Librería de ADNc-N:** librería de ADN complementario normalizado
- **MALDI-TOF:** desorción/ionización laser asistida por matriz por tiempo de vuelo (del inglés *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*)
- **MH-E1:** base de datos *made in house* - ensamblado 1 (ensamblado “de novo”)
- **MH-E2:** base de datos *made in house* - ensamblado 2 (ensamblado “de novo” guiado por referencia)
- **min:** minutos
- **m/z:** relación masa/carga
- **MS:** espectrometría de masas
- **MS/MS:** espectros de fragmentación de péptidos o espectrometría de masas tándem
- **Ni-NTA:** Níquel-ácido nitrilotriacético
- **NGS:** Secuenciación de Nueva Generación (del inglés, *Next Generation Sequencing*)
- **nt:** nucleótidos
- **ORF:** marco de lectura abierta (del inglés, *Open Reading Frame*)
- **PAGE:** electroforesis en geles de poliacrilamida (del inglés, *polyacrylamide gel electrophoresis*)
- **pb:** par(es) de bases
- **PBS:** Tampón fosfato salino
- **PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa
- **PD:** distancia de propiedades (del inglés, *property distance*)
- **PEG8000:** polietilenglicol 8 kDa
- **pI:** punto isoeléctrico
- **pm:** peso molecular
- **PMF:** huella peptídica de la proteína (del inglés, *peptide mass fingerprint*)
- **ppm:** partes por millón
- **psi:** libra por pulgada cuadra
- **p/v:** relación peso/volumen
- **PVDF:** polifluoruro de vinilideno
- **rAni s 1:** antígeno recombinante Ani s 1
- **rAni s 3:** antígeno recombinante Ani s 3

- **rAni s 4:** antígeno recombinante Ani s 4
- **rAni s 5:** antígeno recombinante Ani s 5
- **rAni s 7:** antígeno recombinante Ani s 7
- **RACE-PCR:** Amplificación Rápida de Extremos de cDNA mediante PCR (del inglés, *Rapid amplification of cDNA ends*)
- **RAST:** pruebas radioalergoabsorbentes
- **RFLP:** polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción
- **RNA-seq:** secuenciación del ARNm
- **r.p.m.:** revoluciones por minuto
- **RPMI:** medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute*
- **s:** segundo
- **SBC:** sensibilidad subclínica
- **SDS:** Dodecil Sulfato Sódico
- **SDS-PAGE:** electroforesis en geles de poli(acrilamida con dodecil sulfato sódico)
- **s.l.:** *sensu latum* "en sentido amplio"
- **SPT:** pruebas cutáneas intraepidérmicas (del inglés, *Skin Prick Test*)
- **s.s.:** *sensu stricto* "en sentido estricto"
- **T^º:** temperatura
- **TAB:** test de activación de basófilos
- **TFA:** ácido trifluoroacético
- **Tris:** trihidroximetil aminometano
- **UC+:** urticaria crónica asociada a sensibilización a *Anisakis* spp.
- **UV/VIS:** ultravioleta-visible
- **V:** voltios
- **WHO/IUIS:** Organización Mundial de la Salud y Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (*World Health Organization* and *International Union of Immunological Societies*)

Resumen

Aplicación de las técnicas “ómicas” en la búsqueda de genes implicados en patología alérgica asociadas a la infección por *A. simplex* s.l.

Los procesos alérgicos asociados a la infección por *A. simplex* s.l. provocan en nuestro país una demanda clínica constante. En los últimos años el diagnóstico y conocimiento de estas entidades clínicas ha aumentado considerablemente, sin embargo existen aspectos asociados a la peculiaridad de su naturaleza aún sin resolver. La infección humana por *A. simplex* s.l. es una parasitosis accidental en la que se desencadenan reacciones alérgicas como mecanismo de defensa encaminado a la expulsión de la larva. Existen fenotipos clínicos asociados a la infección por *Anisakis* spp. ampliamente aceptados como la anisakiosis gastroalérgica o la urticaria crónica asociada a la sensibilización a *Anisakis* spp. Pero además se han descrito casos de asma ocupacional y/o dermatitis de contacto por sensibilización a *Anisakis* spp. cuya relación está sin elucidar. Además hay una conocida comunidad antigénica entre nematodos y artrópodos, y los alérgenos responsables de reacciones cruzadas están sin caracterizar.

Por todo ello en la presente memoria se propuso la búsqueda, identificación y caracterización molecular de nuevos alérgenos (teóricos y demostrados experimentalmente) de la larva 3 de *A. simplex* s.l. a través de la aplicación de técnicas “ómicas”.

Para la predicción “in silico” de alérgenos putativos del parásito, se procedió a sintetizar, secuenciar, ensamblar y anotar el transcriptoma de la L3 de *A. simplex* s.l. Con el fin de aumentar la calidad de los genes obtenidos se realizaron dos ensamblados del transcriptoma MH: inicialmente un ensamblaje “de novo” (MH-1) y posteriormente un ensamblaje “de novo” guiado por referencia (MH-2) aprovechando la publicación, por parte de Sanger, del genoma de *A. simplex* s.l. Se ha descrito que los antígenos ES son los principales responsables de las reacciones alérgicas que se desencadenan en la infección por *A. simplex* s.l. en humanos, por lo que se creó una base de datos con las proteínas de ES de *A. simplex* s.l. obtenidas del transcriptoma. La predicción de proteínas potencialmente alérgicas se realizó mediante comparación de los *contigs* con la base de datos de ES y de las secuencias de los alérgenos presentes en las tres bases de datos de moléculas alérgicas *Allergome*, *Allermatch*, *FARRP*. El utilizar un enfoque que combina comparaciones de secuencias primarias de alérgenos con moléculas de ES permite obtener predicciones más realistas. Mediante esta aproximación se predijeron un total de 24 alérgenos pertenecientes a 13 familias de alérgenos, según la clasificación de la base de datos de familias de alérgenos *AllFam*. Algunos de estos alérgenos putativos pertenecían a familias de alérgenos muy importantes, como la familia de tioredoxinas (AF023), en la que se predijeron tres alérgenos correspondientes a disulfuro-isomerasas estructuralmente diferentes (AT-3, AT-13 y AT-19) o la familia mano EF (AF007). Bastantes de los alérgenos identificados (disulfuro-isomerasas, proteínas de choque térmico, proteínas del veneno de himenópteros y proteínas D7) presentaban similitud

con proteínas en otros nematodos, insectos y crustáceos, lo que indicaría reacciones cruzadas. Sería interesante caracterizar estos alérgenos y establecer/descartar su papel real en la infección así como, las interferencias diagnósticas que derivan de esta comunidad antigénica. Los resultados apuntan a la importancia de los inhibidores de serin proteasas en los procesos alérgicos asociados a la infección por *Anisakis* spp. Tres de los alérgenos predichos (AT-3, AT-4 y AT-7) son inhibidores de serin proteasas, uno de ellos con similitud al alérgeno Ani s 6 previamente caracterizado. El alérgeno principal Ani s 1 también pertenece a este grupo. Este enfoque “in silico” aunque genera resultados, sin duda interesantes y con utilidad práctica, presenta limitaciones ya que muchos de los epítomos IgE son conformacionales y no se identifican mediante esta aproximación.

La búsqueda y posterior caracterización molecular de alérgenos identificados experimentalmente se llevó a cabo por inmunocribado asociado a las técnicas de proteómica, basadas en espectrometría de masas, combinado con técnicas bioinformáticas. Los productos de ES de L3 de *A. simplex* s.l., recogidos a partir de cultivos, se utilizaron como fuente de antígenos. Para el inmunocribado se utilizaron conjuntos de sueros de 4 grupos de pacientes seleccionados prospectivamente según criterios clínicos y analíticos como: anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización a *Anisakis* spp. (UC+), anisakiosis digestiva (D) y sensibilización subclínica (SBC). Este enfoque permitió, además de la identificación de 12 nuevos alérgenos, comprobar el reconocimiento diferenciado de alérgenos según las entidades clínicas estudiadas, siendo los pacientes aquejados de AGA los que mostraron el patrón de inmunorreconocimiento más intenso. El alérgeno más inmunorreactivo (ATP-1) en todos los grupos de pacientes alérgicos estudiados coincidió con uno de los predichos previamente “in silico”, AT-10. Este hecho junto con el análisis “in silico” de sus potenciales epítomos IgE, utilizando como molde epítomos identificados experimentalmente en proteínas similares de otros organismos, sugiere que sea uno de los alérgenos inductores de las reacciones alérgicas que se producen tras la infección por *A. simplex* s.l., y se plantee su posible papel en las reacciones cruzadas descritas entre *A. simplex* s.l. y el veneno de los vespídeos.

Finalmente, se llevó a cabo la caracterización molecular e identificación de los genes que expresan los alérgenos principales Ani s 7 y Ani s 14, cuyas secuencias están incompletas a pesar de su alta capacidad diagnóstica. El análisis “in silico” y mediante clonación del alérgeno Ani s 7 de *A. simplex* s.l. sugiere que Ani s 7 es un miembro de una familia multigénica, que incluye distintas copias de la molécula, así como 3 genes parálogos (PAR-1, PAR-2, PAR-3). Los genes ortólogos en ambas especies gemelas (*A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*) y el descrito actualmente (*A. simplex* s.l.) muestran una alta homología entre ellos, lo que apoyaría el uso de este polipéptido como herramienta diagnóstica para los casos de los procesos alérgicos asociados a la infección por *A. simplex* s.l. Los alérgenos Ani s 7 y Ani s 14 de *A. simplex* s.l. presentan una estructura característica de repeticiones en tándem, con elevado contenido de cisteínas y posibles sitios de N-glicosilación, que rinden moléculas de alto peso molecular alérgicas. El estudio detallado de sus secuencias revela la presencia de múltiples epítomos de unión a IgE. La presencia de estos epítomos repetidos explica la alta sensibilidad diagnóstica de ambos recombinantes. La

disponibilidad de una información detallada de las secuencias de los alergen^{os} Ani s 7 y Ani s 14 permitirá la selección de las repeticiones más idóneas, la expresión como proteínas recombinantes para su uso, solas o combinadas, en el diagnóstico de los procesos alérgicos asociados a la infección por *A. simplex* s.l.

Summary

Application of –omics approaches to search genes involved in allergic clinical disorders associated with *A. simplex* s.l. infection

The allergic reactions associated with the *A. simplex* s.l. infections cause constant clinical demand in our country. During the last years, both diagnosis and knowledge of the anisakiasis different clinical entities have considerably increased, although they are several aspects associated to the peculiar nature of the disease still unresolved. The human infection by *A. simplex* s.l. is an accidental parasitosis that triggers allergic reactions as mechanisms for the nematode larvae expulsion. There are several clinical phenotypes associated to *Anisakis* spp. infection that are largely accepted; for example, gastro-allergic anisakiasis (GAA) or *A. simplex* s.l. sensitization associated chronic urticaria (CU+). In contrast, occupational asthma and/or contact dermatitis cases by *Anisakis* spp. sensitization were reported, even though the relationship between the disorders and the nematode has not been explained so far. In addition, there is a big antigenic community, including allergens, non-characterized and shared by both nematodes and arthropods, which are responsible of the frequent cross-reactions observed between the two groups of organisms.

Based on this background, the main goal of the present work was the search, identification and molecular characterization of new allergens (theoretical and experimentally demonstrated) from *A. simplex* s.l. larvae 3, using “omics” approaches.

For “in silico” prediction of putative allergens of the parasite, the synthesis, sequencing, sequences assembly and annotation of the *A. simplex* s.l. larvae 3 transcriptome were undertaken. To ameliorate the quality of the gene sequences obtained, two assemblies from the *A. simplex* s.l. larvae 3 transcriptome were prepared, MH-1 and MH-2: first a “de novo” assembly (MH-1), and later a “de novo” assembly guided by closely related references” (MH-2), taking advantage of the publication of *A. simplex* s.l. genome by Sanger. Also a database with ES proteins from *A. simplex* s.l. was prepared, derived from the transcriptome data; the ES database was created based on the literature that described ES antigens as the major responsible of the allergic disorders associated to human infection by *A. simplex* s.l. Prediction of potentially allergenic proteins was carried out by comparing the *contigs* against the ES database and the allergenic sequences included into *Allergome*, *Allermatch*, *FARRP* databases. The approach of comparing by combination of both primary sequences of allergens and ES molecules permits to obtain more realistic predictions. Thus, 24 allergens were predicted; the predicted allergens were members of 13 allergen families according to *AllFam* (database of allergen families). Several *A. simplex* s.l. allergens belong relevant allergen families such as EF-hand proteins family (AF007) or thioredoxin family (AF023); regarding the latter three predicted allergens were three different disulfide isomerases (AT-3, AT-13 and AT-19). Quite a lot of the identified allergens (disulfide isomerases, heat shock proteins, hymenoptera venom proteins and D7 proteins), it is noteworthy they showed

similarity with proteins described in other nematodes, insects and crustacean, which could be related with cross-reactions. It would be relevant to characterize such allergens to establish/discard their real role in infection, as well as in diagnosis interferences derived from the antigenic community described. The results indicate the importance of serin protease inhibitors in the allergic disorders associated with *Anisakis* spp infection. Three predicted allergens (AT-3, AT-4 and AT-7) are serin proteases inhibitors, one of them showing similarity with Ani s 6 previously described. Also, Ani s 1 belongs to this group of proteins. Although the “in silico” approach used yielded interesting and practical results, it also showed some limitations because many IgE-epitopes are conformational and they could not be identified.

The experimental search of allergens, besides their molecular characterization, was undertaken by immunoscreening and mass spectrometry (MS)-proteomic analysis, combined with bioinformatics techniques. The collection of ES products from *A. simplex* s.l. L3 cultures were used as antigen source. To carry out the immunoscreening four groups of patients were prospectively selected according to both analytical and clinical criteria; they were classified as: gastro-allergic anisakiasis (GAA), *A. simplex* s.l. sensitization associated chronic urticarial (CU+), digestive anisakiasis (D), and subclinical sensitization (SBC). By this experimental approach, twelve new allergens were identified; in addition, it was confirmed the differential recognition patterns showed by the clinical entities analyzed, being AGA patients the ones with the strongest immunorecognition profile. The allergen (ATP-1) was the highest immunoreactive within all the different clinical groups checked and it was equal to the “in silico” predicted allergen AT-10. This finding besides the prediction of potential IgE-epitopes by “in silico” approaches, using as models experimentally confirmed epitopes from similar proteins, suggest that the allergen could be related with one of the allergens triggering the allergic reactions after *A. simplex* s.l. infection and lay out its possible role in the described cross-reactions between the nematode and vespids.

Finally, the molecular characterization and the identification of the full genes encoding the major allergens Ani s 7 and Ani s 14 were carried out, considering their relevant diagnostic properties. In the case of Ani s 7, the results obtained by “in silico” analysis, besides its RACE-cloning, suggest that Ani s 7 is a member of a multigenic family, with several gene copies as well as three paralogous genes (PAR-1, PAR-2, PAR-3). The orthologous genes in the sibling species, *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii*, showed a high homology which supports the use of the polypeptide as a diagnostic tools to detect the allergic cases associated to *A. simplex* s.l. infection. Both Ani s 7 and Ani s 14 have a characteristic structure of tandem repeats, with a high proportion of cysteine residues and potential N-glycosylation sites which yield native allergens of high molecular weight. The precise study of the amino acid sequences of both allergens reveals the presence of multiple hypothetical IgE-epitopes, which could be related with the high diagnostic sensitivity showed by the corresponding recombinant antigens. The availability of the detailed characteristics of the sequences of the major allergens Ani s 7 and Ani s 14 will permit the selection of the repeats more adequate to be cloned and expressed as recombinant antigens for their use, separated or

combined, in the differential diagnosis of the allergic clinical disorders associated with *A. simplex* s.l. infection.

INTRODUCCIÓN

1. Anisakidosis: clasificación taxonómica de los agentes causales y transmisión al hombre

Los miembros de la familia Anisakidae se incluyen en la clase Nematoda, subclase Secernentea, orden Ascaridida, suborden Ascaridina, superfamilia Ascaridoidea. Comprenden 24 géneros de los cuales los más conocidos son *Pseudoterranova* (Krabbe, 1878), *Contracaecum* (Railliet y Henry, 1913) y *Anisakis* (Dujardin, 1845) (Mattiucci *et al.*, 2002). Se ha acordado que el término a utilizar para nombrar las enfermedades producidas por los miembros de la familia Anisakidae es anisakidosis y a la enfermedad causada por las especies del género *Anisakis* anisakiosis (Kassai *et al.*, 1988).

Estos nematodos se establecen en mamíferos marinos e infectan accidentalmente al hombre, a través de la ingesta de pescados o cefalópodos crudos o poco cocinados (boquerones en vinagre, ceviches y variedades de cocina japonesa como sushi o sashimi, etc.) los cuales son hospedadores paraténicos y contienen la larva 3 parasitaria (larva infectante). En los humanos, la anisakidosis se produce al ingerir alimentos contaminados con larvas 3 de las especies *Anisakis* spp. (*A. simplex* sensu latum (s.l.), principalmente), o *Pseudoterranova* spp. en menor medida (Yu *et al.*, 2001; Audicana *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2010; Arizono *et al.*, 2011). Una vez consumidos, las larvas llegan al tracto gastrointestinal donde pueden provocar síntomas gastrointestinales de diferente magnitud, que pueden estar asociados a reacciones inmunológicas principalmente de tipo alérgico, de intensidad variable (Audicana *et al.*, 2008). Otras especies, como son las del género *Contracaecum* spp. e *Hysterothylacium* spp., causan raramente anisakidosis en el humano y las posibilidades de desencadenar síndromes alérgicos parecen menos plausibles, aunque aún están en estudio (Ishikura *et al.*, 1993; Yagi *et al.*, 1996; Valero *et al.*, 2003; González-Amores *et al.*, 2015).

De todas las especies de anisakidos descritos, *A. simplex* s.l. es el agente etiológico fundamentalmente implicado en episodios de parasitismo, y la anisakiosis está considerada como un problema emergente de salud (Audicana *et al.*, 2002; Quijada *et al.*, 2005).

Si bien las primeras observaciones de larvas de nematodos en peces, y lesiones en los estómagos de mamíferos marinos, se realizaron en el siglo XIII, no fue hasta mitad del siglo XX cuando se empiezan a estudiar a fondo estos helmintos y sus efectos en humanos. Fue la repercusión comercial negativa en la industria pesquera, especialmente relacionada con la presencia de las larvas de anisakidos en el bacalao capturado en aguas del noreste del Atlántico, y la descripción de los efectos adversos que ocasionan dichas larvas en los pacientes, lo que condujo al estudio en profundidad de dichos nematodos. En 1876, Leuckart describió por primera vez un caso de parasitación humana en un niño groenlandés. En 1955, Straub identificó el agente causal, una larva de un nematodo, detectada en cortes histológicos de una muestra de íleon, de un paciente holandés con un cuadro de oclusión intestinal que reportó haber comido pescado crudo; este caso fue publicado posteriormente, formando parte de una serie de 11 casos. En esta serie, la larva de estadio 3 de *Anisakis* sp. fue clasificada inicialmente, y de manera equivocada, como *Eustoma rotundatum* (Van Thiel *et al.*, 1960). Ya en este artículo los investigadores proponen que

podiese existir algún “factor alérgico”. En 1990, investigadores japoneses refirieron, por primera vez, que *A. simplex* s.l. debía considerarse como el agente etiológico de algunas alergias que se creía, erróneamente, se debían al pescado (Kasuya *et al.*, 1990). Después, en 1995, investigadores españoles describieron el primer caso de anafilaxia inducida por *Anisakis* spp. Se trataba de un paciente que había ingerido pescado, al que le realizaron pruebas cutáneas y determinación de inmunoglobulina E (IgE) específica, siendo éstas positivas para *A. simplex* s.l. y negativas para el pescado implicado en la reacción (Audicana *et al.*, 1995).

Por otro lado, Berland clasificó las larvas de *Anisakis* spp. en dos tipos, llamados *Anisakis* tipo I y II, basados en características morfológicas, como la longitud del ventrículo y presencia o ausencia de mucro al final de la región posterior. Las larvas L3 de *Anisakis* de tipo I difieren de las de tipo II en que las primeras presentan un ventrículo largo y un mucro en su extremo posterior, en cambio en las segundas, el ventrículo es más corto y no tienen mucro (Koyama *et al.*, 1969). Las especies de *Anisakis* tipo I corresponden a las tres especies gemelas del complejo *A. simplex* (*Anisakis simplex* sensu stricto (s.s.), *Anisakis pegreffii* y *Anisakis berlandi*), *Anisakis typica* (Diesing, 1860) y *Anisakis ziphidarum*, y las de tipo II, a las tres especies gemelas del complejo *Anisakis physeteris* (*Anisakis physeteris* (Baylis, 1923), *Anisakis brevispiculata* (Dollfus, 1966) y *Anisakis paggiae*) (Chen *et al.*, 2008; Quiazon *et al.*, 2008).

El complejo *A. simplex* s.l. está compuesto por especies gemelas que son morfológicamente indistinguibles. El desarrollo de técnicas de biología molecular ha permitido la caracterización de las mismas por diferencias en sus estructuras genéticas, mediante técnicas como es el análisis de alozimas y del polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP), secuenciación de la región correspondiente a las subunidades ITS1-5.8S rRNA-ITS2 del ADN ribosomal (ADNr), el gen *cox2* del ADN mitocondrial (ADNmt) que se suman a sus propiedades ecológicas, de distribución geográfica y hospedadores preferentes (Abollo *et al.*, 2003; Pontes *et al.*, 2005; Cavallero *et al.*, 2011; Mattiucci *et al.*, 2014). El ADNr mantiene la homogeneidad en las secuencias dentro de una especie y el análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP), correspondientes a los interespaciadores ribosomales (ITS-1, ITS-2), permite la diferenciación genética entre especies gemelas del complejo *Anisakis* s.l. Por otro lado, el ADNmt es conocido por evolucionar más rápido que el ADN nuclear proporcionando información útil para la reconstrucción filogenética de las especies estrechamente relacionadas en nematodos (Gasser y Monti, 1997; Quiazón *et al.*, 2008).

Diversos estudios han demostrado la presencia de *A. simplex* s.s. principalmente en el este y oeste del océano Atlántico, aunque también se pueden encontrar al oeste del mar Mediterráneo. *A. pegreffii*, por su parte, predomina en el mar Mediterráneo, aunque se ha observado en la costa Ibérica del noreste del Atlántico (Abollo *et al.*, 2003; Cavallero *et al.*, 2012; Mattiucci *et al.*, 2001; Mattiucci y Nascetti, 2006). *A. berlandi* presenta una distribución geográfica variable; así se ha aislado en Canadá (océano Pacífico), Chile, Nueva Zelanda y en la costa del sur de África (océano Atlántico). También se ha identificado una zona simpátrica entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* a lo

largo de la costa atlántica española y portuguesa y en el mar Alborán (Mattiucci *et al.*, 2004; Abollo *et al.*, 2001). Abollo *et al.*, en el año 2003, reportaron por primera vez la presencia de un híbrido de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, sugiriendo el estrecho de Gibraltar como zona híbrida. Por otro lado, *A. ziphidarum* se localiza principalmente en el sur del océano Atlántico (sur de África) aunque se ha encontrado en el mar Mediterráneo, mientras que *A. typica* se ha observado también en aguas tropicales además de en el este del mar Mediterráneo (Chipre) (Mattiucci *et al.*, 2004).

Con respecto a *Anisakis* de tipo II, se ha encontrado *A. paggiae* y *A. brevispiculata* en las costas de Florida de Estados Unidos y en la costa atlántica del sur del continente africano; *A. physeteris* se localiza en el centro del mar Mediterráneo (Mattiucci *et al.*, 2005).

Debido a que las especies más comunes, productoras de anisakiosis, son *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, algunos investigadores efectuaron estudios para determinar su potencial patogénico. En trabajos realizados en pescados, se evidenció que *A. simplex* s.s. presentaba mayor tendencia a migrar hacia el músculo que *A. pegreffii*; capacidad posiblemente relacionada con un mayor potencial para penetrar en el tejido del hombre (Suzuki *et al.*, 2010; Quiazon *et al.*, 2011). Del Carmen Romero *et al.* (2013) confirmaron esta hipótesis al encontrar, en estudios de infecciones experimentales con ratas (*Wistar rat*) que, aunque *A. pegreffii* era capaz de penetrar en la pared gastrointestinal, el riesgo de que penetrara en el tejido es un 65% menor que en el caso de *A. simplex* s.s.

De igual forma, Arizono *et al.*, en 2012 demostraron que *A. simplex* s.s. toleraba mejor el jugo gástrico artificial que *A. pegreffii*; *A. simplex* s.s. además presentó las tasas penetración, significativamente más altas, en el método del agar (agar al 0,75%). Así mismo, Jeon *et al.* (2015) demostraron que *A. pegreffii* presentaba una mayor habilidad de penetración al utilizar el método del agar y emplear en su preparación tampón fosfato salino (PBS), en cambio, *A. simplex* s.s. mostraba una mejor habilidad al emplear el método con medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640); el medio RPMI presenta una composición más similar a las condiciones fisiológicas del estómago humano. En este ensayo, también se estudió la tolerancia al ácido clorhídrico, encontrando que *A. simplex* s.s. exhibía una mayor tasa de supervivencia que *A. pegreffii* (6,1 días *versus* 4,2 días, respectivamente).

Por otro lado, mediante un estudio de proteómica comparativa, se evaluó la posible variabilidad alergénica existente entre estas dos especies de *Anisakis*. Tomando en cuenta que el potencial alergénico depende del número específico de proteínas, alelos o isoformas que muestran inmunoreactividad, consideraron que *A. simplex* s.s., con 34 proteínas diferentes, era potencialmente más alergénico que *A. pegreffii*, con 11 proteínas, y que el híbrido entre las dos especies, con 6 proteínas (Arcos *et al.*, 2014).

1.1 Riesgo de transmisión en España

Como la enfermedad en estudio, y su transmisión, están asociadas a los hábitos alimenticios relacionados con la ingesta de pescado crudo o poco cocinado, la mayoría de los casos de anisakiosis se han descrito en países con estos hábitos alimenticios como Japón, Holanda, Francia, Alemania, Italia y España, entre otros (Orecchia *et al.*, 1989; Huang, 1988; Sanmartin *et al.*, 1994; Plath *et al.*, 2001; Pekmezci, 2014; Sohn *et al.*, 2015; Mladineo *et al.*, 2016). De aproximadamente 20.000 casos de anisakidosis reportados a nivel mundial, el 90% se han producido en Japón, y el resto principalmente en España, Holanda y Alemania (Audicana *et al.*, 2002; Bouree *et al.*, 1995). Arenal *et al.* (1991) fueron pioneros al describir el primer caso de anisakiosis en España.

En nuestro país, según cifras provenientes del informe del consumo de alimentación de 2015 (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente), el consumo medio de pescado fresco, por persona y año, fue de 11,64 kilogramos (Kg), y el de mariscos, moluscos y crustáceos de 6,96 kg. El número de casos de anisakiosis ha ido en aumento, ya que es habitual la ingestión de pescado crudo, poco cocido o conservado en vinagreta (donde, según la concentración y el tiempo de conserva, el parásito puede resistir la acción del vinagre u otros componentes). Además, determinadas costumbres extendidas en las técnicas pesqueras, que favorecen su transmisión, como es la evisceración del pescado fresco y el vertido al mar de las vísceras con gran cantidad de parásitos, determinaría un aumento de los peces infectados al ingerir estos desechos (De la Torre *et al.*, 2000).

Son muchos los estudios realizados acerca de la prevalencia de las larvas de *A. simplex* s.l. en los pescados originarios de los mares del litoral de España. En una investigación llevada a cabo en sardinas (*Sardina pilchardus*) provenientes de diferentes zonas de España (Málaga, Cádiz, Isla Cristina (Huelva), La Coruña y Ondárroa (Vizcaya) se demostró que la mayor prevalencia de larvas se encontraba en sardinas procedentes de La Coruña (28,3%), Ondarroa (5%) y Cádiz (2,5%); con *A. pegreffii* como la especie más abundante en La Coruña (71%) (Molina-Fernández *et al.*, 2015). Otro trabajo realizado en bacaladillas (*Micromesistius poutassou*) determinó una prevalencia del 82% de *A. simplex* s.l., siendo el invierno, la estación donde los valores de intensidad y abundancia eran mayores. Además, mediante caracterización molecular, encontraron una prevalencia de 99,7% de *A. simplex* s.l. (50,1% *A. simplex* s.s., 42,9% *A. pegreffii* y 7% híbrido *A. simplex* s.s. - *A. pegreffii*) y 0,3% de *A. typica* (Gómez-Mateos *et al.*, 2016).

Algo semejante se ha observado con los cefalópodos, considerados como hospedadores paraténicos en el ciclo biológico de *Anisakis* spp. Algunos estudios revelaron la presencia de larvas de anisakidos en cefalópodos destinados al consumo humano, confirmando su capacidad potencial en la transmisión de la anisakidosis. Un ejemplo de ello, fue el trabajo de Picó-Durán *et al.*, en el año 2016, en el que analizaron la prevalencia de larvas de nematodos en cefalópodos comerciales del este del Mar Mediterráneo. Dichos investigadores demostraron una

prevalencia del 12,2% para *Anisakis* spp. y un 4,1% para *Hysterothylacium* spp. Las larvas se encontraron en calamares (*Illex coindetii*) con una mayor proporción de *A. pegreffii* (11,4%), y una menor de *A. physeteris* (1,6%).

Por otro lado, es importante resaltar la presencia de anticuerpos frente a *A. simplex* s.l., en la población española presuntamente sana. Un estudio realizado en el año 2001, en tres áreas del país, reveló una sensibilización del 13,1% frente al parásito (IgE anti-*Anisakis*), en pacientes sin historia de reacciones alérgicas, además de descubrir que la prevalencia de sensibilización y alergia a *Anisakis* es mayor en el centro de España, donde es frecuente la ingesta de pescado crudo (Fernández de Corres *et al.*, 2001). De igual manera, otra investigación determinó un aumento de dicha sensibilización (22,1%), en el año 2006, en donantes de sangre en Antequera (Del Rey Moreno *et al.*, 2006). Al comparar estas cifras con las obtenidas en estudios realizados en otros países, encontramos una sensibilización frente a *A. simplex* s.l. en el 10% de la población sana en Japón, mientras que en Croacia era del 2-2,5% (dependiendo del área) y del 0,4% en donantes de sangre en Noruega (Kasuya y Koya, 1992; Lin *et al.*, 2014; Mladineo *et al.*, 2014).

2. Patología y sintomatología

La patología y sintomatología de la anisakiosis es causada principalmente por dos mecanismos: reacciones alérgicas y daño directo al tejido. Al contrario de lo que ocurre con otros helmintos, que están adaptados al humano, en los que las respuestas clásicas Th2 están compensadas a través de mecanismos reguladores (lo que se conoce como “respuestas Th2 modificadas”), en el caso de *Anisakis* spp. el humano es un hospedador accidental por lo que no existe adaptación parásito-hospedador y se producen “respuestas Th2 inflamatorias” con una menor participación de componentes reguladores (Treg) y mayor de inflamatorios (Th17) que desembocarían en reacciones fibróticas y alérgicas (Díaz y Allen, 2007).

El daño tisular ocurre cuando, una vez ingerida, la larva penetra la mucosa gastrointestinal del hospedador con la ayuda del diente anterior, y los productos de las células excretoras y la glándula esofágica dorsal (Buzel y Sommerville, 1985). Estas últimas son las encargadas de producir y liberar proteínas, algunas de ellas con actividad enzimática de tipo proteasa, que se ha demostrado que son capaces de degradar *in vitro* varios componentes de la matriz extracelular de la pared gastrointestinal, como fibronectina, laminina o colágeno (Sakanari y McKerrow, 1990). La mayoría de los helmintos producen proteasas implicadas en procesos como la migración tisular, la digestión de tejidos del hospedador, la obtención de nutrientes, la muda cuticular e incluso en procesos de inmunorregulación (Maizels *et al.*, 2011; McSorley y Maizels, 2012). Sakanari y McKerrow (1990) comprobaron que las larvas de *A. simplex* eran capaces de degradar tejido conectivo de la matriz extracelular y caracterizaron bioquímicamente dos clases de proteasas (metaloaminopetidasa y serin proteasas de tipo tripsina) presentes en los productos de excreción-secreción (ES) del parásito. Diversos autores describieron moléculas de 54,3 kDa

(Matthews, 1984), 23,4 y 46 kDa (Kennedy *et al.*, 1988), 25 a 26 kDa (Sakanari *et al.*, 1989), 40 kDa (Hotez *et al.*, 1994) y 30 kDa (Morris *et al.*, 1994), con actividades proteolíticas diversas, aisladas de los productos de ES de larvas de *A. simplex* s.l. cultivadas *in vitro*. También, diversos autores describieron 5 inhibidores de serin proteasas con diferentes actividades inhibitorias (Morris *et al.*, 1994; Nguyen *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2007-a; Kobayashi *et al.*, 2008; Valdivieso *et al.*, 2015).

Además, los productos metabólicos liberados por la larva también tienen una gran importancia desde el punto de vista inmunológico. Así las respuestas humorales y celulares observadas en lesiones agudas se concentran principalmente alrededor de la región oral del nematodo, lo que sugiere que quizás estas lesiones podrían inducirse mayoritariamente por los antígenos de ES elaborados por la larva (Bier *et al.*, 1976; Bier y Raybourne, 1988; Ishikura *et al.*, 1990).

Esta serie de eventos dan lugar a signos y síntomas que se traducen en las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad.

2.1 Formas clínicas de la anisakiosis

Las manifestaciones clínicas que tienen lugar en los pacientes parasitados por *A. simplex* s.l., varían según la localización de la larva en las distintas zonas del tracto gastrointestinal, y de la respuesta que se desencadena en el hospedador. Las 4 principales entidades clínicas relacionadas con este parásito son la anisakiosis gástrica (GA), anisakiosis gastroalérgica (AGA), anisakiosis intestinal (IA) y anisakiosis extra-gastrointestinal o ectópica (EA).

2.1.1 Anisakiosis gástrica

Después de la ingestión, las larvas pueden quedar adheridas a la mucosa gástrica, provocando lo que se denomina anisakiosis gástrica aguda o pueden penetrar el estómago del hospedador (o pared intestinal en el caso de la anisakiosis intestinal) dando lugar a una anisakiosis crónica. En la mayoría de los casos, la infección es producida por especies de *A. simplex* s.l.

En los casos de afectación gástrica aguda, los síntomas aparecen tras un período de latencia (1 a 24 h) desde la ingesta del pescado crudo. La intensidad de la sintomatología depende de la respuesta inflamatoria y del grado de penetración del parásito en la mucosa gástrica. El síntoma más frecuente es la epigastralgia intensa, que no mejora con los analgésicos habituales, asociada frecuentemente a náuseas, vómitos, distensión abdominal, anorexia, fiebre y urticaria (Sugimachi *et al.*, 1985; Muraoka *et al.*, 1996; Repiso *et al.*, 2003; Sohn *et al.*, 2015). Algunos autores señalan otras formas de presentación menos frecuentes, como dolor torácico (Sugano *et al.*, 1993; Machi *et al.*, 1997), hematemesis o melenas (Castán *et al.*, 2002). Estos síntomas son poco específicos y pueden ser confundidos con otras enfermedades digestivas (Matsumoto *et al.*, 1992).

En la mayoría de los casos, los pacientes presentan alteraciones hematológicas como una marcada leucocitosis, y al contrario de lo que ocurre en otras helmintosis, raramente se observa eosinofilia periférica. Habitualmente, la eosinofilia aparece tras varios días de leucocitosis. Se produce un fenómeno de reclutamiento local, en el cual los eosinófilos son estimulados a la zona del foco inflamatorio donde la larva ha penetrado (Matsui *et al.*, 1985; Kakizoe *et al.*, 1995; Moreno-Ancillo *et al.*, 1997).

Aunque los eosinófilos son incapaces de destruir directamente *in vitro* larvas de *A. simplex* s.l. (Deardorff *et al.*, 1991), el infiltrado eosinofílico del tejido circundante al parásito, es una de las características más relevantes de las lesiones inflamatorias locales observadas en la anisakiosis. La presencia de estas células puede reflejar el estadio tardío de una respuesta inmune de hipersensibilidad tipo I, tras la liberación de factores quimiotácticos durante la etapa aguda de la respuesta (Iwasaki *et al.*, 1982). Por consiguiente, la respuesta eosinofílica se observa principalmente a nivel local, no es sistémica y se asocia con los parásitos vivos o con la exposición a antígenos liberados por *A. simplex* s.l. Es por ello que, en ocasiones, cuando no es posible la extracción de la larva por endoscopia digestiva, el dolor persiste durante días hasta que el nematodo muere en el interior de la mucosa, destruido por las defensas del hospedador, dejando un granuloma eosinófilo residual autolimitado (López-Vélez *et al.*, 1992). Como se ha mencionado anteriormente, aunque la eosinofilia periférica sea una característica de las enfermedades ocasionadas por helmintos, son pocos los casos de anisakiosis donde se ha descrito eosinofilia (Ishikura, 1990; Ohta *et al.*, 1995).

Eventualmente, debido a la naturaleza inespecífica de los síntomas, los casos agudos son erróneamente diagnosticados y la infección se torna crónica, pudiendo llegar a tener una duración de meses, dificultando aún más el diagnóstico de la enfermedad (Ito *et al.*, 2007). Debido a ello, una de las claves a tener en cuenta para el correcto diagnóstico de anisakiosis, es una historia de ingesta de pescado crudo o poco cocinado (Couture *et al.*, 2003). La visualización de la larva a través del endoscopio permite el diagnóstico y tratamiento definitivo, con la extracción de la misma, en los casos agudos, aunque en algunas ocasiones la larva pueda estar oculta entre los pliegues gástricos o pueda confundirse con el moco gástrico (Kakizoe *et al.*, 1995; Zullo *et al.*, 2010).

2.1.2 Anisakiosis gastroalérgica

Se define como un cuadro alérgico agudo típicamente acompañado de síntomas gástricos, y es consecuencia de la asociación de síntomas de una parasitación aguda y la correspondiente respuesta de anticuerpos tipo IgE desencadenada por el hospedador contra el parásito (López-Serrano *et al.*, 2000-a).

La alergia ocurre al exponerse a pescado parasitado, como una respuesta inmediata, inmunológicamente mediada por IgE, frente a un contaminante biológico del pescado (*Anisakis*) y

no frente a proteínas propias del alimento. Es el parásito vivo (que parasita la mucosa gástrica) el desencadenante de los síntomas clínicos en pacientes sensibilizados (Alonso *et al.*, 1997; Daschner *et al.*, 1998). De hecho, se han realizado ensayos, mediante la ingesta de larvas liofilizadas, por parte de pacientes con una historia sugestiva y sensibilizados a *A. simplex* s.l., en los que se demuestra la inexistencia de síntomas gástricos ni alérgicos tras la ingesta de las larvas (Sastre *et al.*, 2000). Posteriormente, Alonso-Gómez *et al.* (2004) realizan pruebas de provocación administrando larvas de L3 de *A. simplex* s.l. congeladas, a pacientes sensibilizados a *Anisakis* spp. con gastroscopia positiva, negativa o sin gastroscopia, siendo los resultados negativos en todos los casos.

El cuadro alérgico agudo suele presentarse entre 15-30 minutos y 2 horas tras la ingesta de pescado, y la mayoría de los casos se han presentado en adultos que nunca habían sufrido alergias a pescados u otros alimentos. Los signos y síntomas pueden oscilar desde lesiones circunscritas a la piel (urticaria con habones generalizados pruriginosos), al sistema digestivo (náuseas y vómitos), afectación del sistema respiratorio (angioedema), hasta shock anafiláctico (Choi *et al.*, 2009; Chung y Lee, 2014).

2.1.3 Anisakiosis intestinal

Se caracteriza por dolor abdominal, intermitente o constante, que comienza entre el quinto y séptimo día después de la ingestión de la larva. Aunque algunos autores apuntan que, en la mayoría de los casos de anisakiosis españoles la afectación gástrica representa entre el 60 al 70% de las parasitaciones (López *et al.*, 2000), otros autores afirman haber observado una mayor afectación intestinal, siendo el íleon terminal el segmento implicado con más frecuencia (Repiso *et al.*, 2003; Castán *et al.*, 2002); probablemente el pH alcalino del intestino dificulte la estancia del parásito durante un largo período de tiempo (Matsumoto *et al.*, 1985; Ishiguro *et al.*, 2001). Por contra, el colon y el yeyuno son los segmentos menos afectados (Shirahama *et al.*, 1992).

Los individuos infectados pueden desarrollar ascitis y/o signos peritoneales. Algunos autores describen complicaciones poco frecuentes de la anisakiosis intestinal tales como, obstrucción del intestino delgado (Appleby *et al.*, 1982; Kim *et al.*, 1991; Shweiki *et al.*, 2014) e intestino grueso (Schuster *et al.*, 2003); los casos colónicos, simulan con frecuencia, un tumor de colon (Riu Pons *et al.*, 2015). Otras complicaciones descritas son estenosis ileal, intususcepción (invaginación intestinal), perforación intestinal y neumoperitoneo (Ito *et al.*, 2007; Kanisawa *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2003). Los estudios de imagen suelen revelar edema de mucosa, engrosamiento irregular de la pared intestinal, linfadenopatías y/o ascitis (Hochberg y Hamer, 2010).

En los casos de anisakiosis intestinal crónica, se pueden presentar síntomas similares a un cuadro de apendicitis, úlcera gastroduodenal, colitis eosinofílica, enfermedad inflamatoria intestinal y obstrucción intestinal (Sugimachi *et al.*, 1985; Muraoka *et al.*, 1996). Algunos autores han reportado casos de granulomas eosinofílicos secundarios a *A. simplex* s.l., la mayoría

localizados en el segmento ileal del intestino (Asami *et al.*, 1965; Yokogawa y Yoshimura, 1965; Rosales *et al.*, 1999; Takekawa *et al.*, 2004; Bao Pérez *et al.*, 2005; Marzocca *et al.*, 2009).

2.1.4 Anisakiosis extragastrointestinal

Los casos de anisakiosis extragastrointestinal son menos comunes que las formas digestivas y ocurren cuando las larvas de *A. simplex* s.l. atraviesan la pared intestinal alcanzando la cavidad peritoneal. Algunos autores han descrito casos de larvas localizadas en el mesenterio (Céspedes *et al.*, 2000), nódulos omentales (Cancrini *et al.*, 1997; Takekawa *et al.*, 2004), nódulos linfáticos mesocólicos (Kim *et al.*, 1997) y en el bazo (Testini *et al.*, 2003). Además, se han documentado casos de larvas de *A. simplex* s.l. en la cavidad pleural, que han entrado desde la cavidad peritoneal, mediante la penetración del diafragma, causando así derrame pleural eosinofílico (Matsuoka *et al.*, 1994; Saito *et al.*, 2005). También se han reportado casos de larvas en estructuras de la vía aérea superior, donde la larva “retrocede” desde el esófago hacia las amígdalas o faringe (Bhargava *et al.*, 1996; Kwak y Yoon, 2012). Otros autores han expuesto casos de poliartritis (Fabresse *et al.*, 1984; Arenal *et al.*, 1991) y de anisakiosis en el parametrio de una paciente (Ramanan *et al.*, 2013).

Por otro lado, Yeum *et al.*, 2002, describieron un caso en el que se relata la presencia de una larva de *A. simplex* s.l. en el líquido ascítico proveniente de una diálisis peritoneal continua ambulatoria sin evidencia de peritonitis, mientras que Ohta *et al.*, 1995 reportaron un caso de peritonitis ocasionada por el parásito.

2.1.5 Otras formas clínicas asociadas a la infección por *Anisakis*

2.1.5.1 Urticaria crónica asociada a sensibilización con *Anisakis*

Algunos investigadores consideran dentro de la urticaria crónica un fenotipo que presenta características clínicas e inmunológicas diferentes a las generales y que se asocia, posiblemente, con un parasitismo anterior agudo por *A. simplex* s.l. Los pacientes aquejados de urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis*, presentan IgE específica frente a *A. simplex* s.l. y a menudo afirman que la exacerbación de la urticaria se asocia con la ingesta de pescado (Daschner *et al.*, 2010; Daschner *et al.*, 2015).

2.1.5.2 Otras formas clínicas

Otros investigadores postulan la existencia de aeroalergenos que puedan ser incluso responsables de alergias ocupacionales. Nieuwenhuizen *et al.* (2006) establecen una asociación entre dermatitis e hiperreactividad bronquial con sensibilización a *Anisakis* spp. en trabajadores encargados de manipular el pescado; esta asociación, además, se correlacionaba con una alta ingesta de pescado. Se han descrito otros casos de asma ocupacional y/o dermatitis de contacto

por sensibilización a *Anisakis* spp. (Barbuzza *et al.*, 2009; Bertuccio *et al.*, 2010; Nieuwenhuizen *et al.*, 2016).

2.2 Anisakiosis y cáncer

Existen casos en la literatura, en los cuales proponen a *A. simplex* s.l. como un posible factor de riesgo para el desarrollo de cáncer. Se cree que es el resultado de la combinación de la acción mecánica de la larva durante la invasión del tejido, los efectos directos, ejercidos por los productos de ES del parásito, sobre el tejido, y la compleja interacción entre el sistema inmunológico del hospedador y los antígenos del parásito que promueven una inflamación persistente y/o la formación de granulomas (Petithory *et al.*, 1990; Audicana *et al.*, 2008; García-Pérez *et al.*, 2015). Algunos casos describen la asociación entre anisakiosis crónica con pólipos en el colon (Herranz-Bachiller *et al.*, 2012), tumores mesentéricos (Céspedes *et al.*, 2000; Menéndez, 2015) y carcinoma de colon (Mineta *et al.*, 2006; Yoo *et al.*, 2008).

Con el fin de determinar el posible factor de riesgo que supone la anisakiosis en el desarrollo de tumores gastrointestinales, se realizó un estudio en el año 2015, en pacientes con cáncer gastrointestinal, sin historia previa de infección por *Anisakis* spp. a los cuales se les realizó una determinación de niveles séricos de anticuerpos IgE, inmunoglobulina A subclase 1 (IgA1) e inmunoglobulina G subclase 1 (IgG1) frente a los antígenos recombinantes de *A. simplex* s.l., Ani s 1, Ani s 5, Ani s 9 y Ani s 10, determinados mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Los resultados pusieron de manifiesto un ratio de positividad de los anticuerpos IgA1 frente a los antígenos recombinantes Ani s 1 (rAni s 1; 38,30% vs 6,38%; $P < 0,001$) o rAni s 5 (rAni s 5; 42,55% vs 10,64%; $P < 0,001$) significativamente más alto en los pacientes con cáncer en comparación con el grupo control. Al realizar la evaluación por tipo de tumor, se vio que el grupo de pacientes con cáncer gástrico presentaban una mayor proporción de positivos (IgA1) frente al alérgeno rAni s 1 mientras que el grupo de los pacientes con cáncer de colon, mostraban una alta proporción de positivos (IgA1) frente a ambos antígenos Ani s 1 y Ani s 5; como conclusión se sugiere la posibilidad de que una infección previa por *Anisakis* spp. pueda ser un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gastrointestinal (tanto gástrico como de colon) (García-Pérez *et al.*, 2015).

De todo lo anterior, se deduce que el diagnóstico de las diferentes formas clínicas de la anisakiosis y/o de los procesos alérgicos asociados a la infección por *Anisakis* spp. es complejo, debido a la poca especificidad de sus síntomas, y considerando que el diagnóstico definitivo se establece mediante la visualización de las larvas, ya sea a través de técnicas endoscópicas o biopsia. No obstante, se necesita de otras herramientas que permitan establecer una sospecha diagnóstica tales como la historia clínica (inicio de los síntomas abdominales tras la ingesta de pescado crudo o poco cocinado), estudios de imagen y técnicas inmunológicas (Repiso *et al.*, 2003; Hochberg y Hamer, 2010).

3. Diagnóstico inmunológico de la anisakiosis

Durante las últimas décadas, se han desarrollado multitud de pruebas para el diagnóstico inmunológico, fundamentalmente serológico, de la anisakiosis. En estos ensayos, según su base metodológica, se aprovecha la respuesta inmune que el paciente desarrolla tras el contacto con el parásito. Se han empleado extractos más o menos purificados de *Anisakis* spp., moléculas únicas del mismo, y se han caracterizado las diferentes respuestas generadas, especialmente ciertos isotipos de anticuerpos que el paciente genera frente al nematodo. Para ello se han utilizado distintas pruebas: inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación, pruebas de fijación del complemento, inmunoelectroforesis, ELISA, pruebas radioalergoabsorbentes (RAST) y variantes de inmunoensayo fluoroenzimático (FEIA), etc. (Akao *et al.*, 1989; Akao *et al.*, 1990; Petithory *et al.*, 1991; Kasuya y Koga, 1992; Lorenzo *et al.*, 2000). De todas ellas, las pruebas cutáneas *in vivo* (*skin prick test*), las pruebas de liberación de diferentes mediadores, histamina, basófilos, etc., y las pruebas serológicas basadas en la determinación de IgE específica e IgE total a través de metodologías como ELISA, FEIA y *western blotting*, son las más empleadas actualmente (Del Pozo *et al.*, 1996; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2007; Caballero *et al.*, 2012). Los sistemas de detección de IgE específica basados en el uso de antígenos recombinantes, como la combinación del Ani s 7 y el Ani s 1 aportan una mayor sensibilidad y especificidad (Anadón *et al.*, 2010). A continuación, se describen con más detalle los ensayos habitualmente empleados en el diagnóstico inmunológico de anisakiosis.

3.1 Diagnóstico inmunológico *in vivo*

3.1.1 Pruebas cutáneas *in vivo*: *Skin Prick Test* (SPT)

Se basa en la reproducción de una reacción de hipersensibilidad tipo I mediada por anticuerpos IgE, al introducir en la epidermis, con una lanceta adecuada, un extracto del alérgeno sospechoso, que desencadena en los individuos sensibilizados la liberación de histamina mediante la degranulación de mastocitos cutáneos. A los cinco minutos de la inoculación del alérgeno comienza la liberación de mediadores de los mastocitos, como la histamina y la triptasa, que alcanzarán su pico máximo antes de los 30 minutos, provocando una pápula y eritema en la zona de la punción (Demoly *et al.*, 1991; Rodríguez *et al.*, 2004; Torres y Fontán, 2013).

Es una técnica que brinda en general, buena sensibilidad, sencillez, rapidez, bajo coste y seguridad. Por el contrario, diversos estudios han confirmado la baja especificidad de la técnica debido a lo poco específicos que son los antígenos empleados, lo que conlleva a un sobre-diagnóstico de alergia a *Anisakis* spp. Estudios realizados anteriormente habían demostrado una alta prevalencia de falsos positivos en población sana; 27,4% en un estudio realizado en España y 10% en Japón (García *et al.*, 1997; Kasuya y Koga, 1992). Por otra parte, Del Pozo *et al.*, en el año 1996, obtuvieron resultados falsos positivos en pacientes con alergia al pescado. Además, se

demostró reacción cruzada (35%) al llevar a cabo la prueba cutánea con un extracto crudo de *Ascaris suum*, en pacientes con síntomas alérgicos y/o gastroalérgicos relacionados con la ingesta de pescado (Rodero *et al.*, 2004).

Por lo tanto, SPT se utilizan como herramienta inicial para el diagnóstico de los procesos alérgicos asociados a *Anisakis* spp., pero es necesario realizar pruebas complementarias para obtener el diagnóstico preciso de la enfermedad.

3.2 Diagnóstico inmunológico *in vitro*

3.2.1 Test de activación de basófilos (TAB)

La cuantificación de la activación de basófilos (TAB), realizada a través de citometría de flujo, es una herramienta que permite valorar en pacientes alérgicos la activación de los basófilos, después de la estimulación específica con un antígeno (respuesta inmediata a alergenitos mediada por anticuerpos IgE) y en ella se emplean diversos marcadores de superficie de membrana para la cuantificación (Nakagawa *et al.*, 1981; Knol *et al.*, 1991; Gane *et al.*, 1993). González-Muñoz *et al.*, en el año 2005, obtuvieron una sensibilidad del 95-100% y una especificidad del 100%, y pudieron diferenciar entre pacientes con procesos alérgicos inducidos por *Anisakis* spp. y grupos controles. Mientras que Martínez-Aranguren *et al.*, en 2014, encontraron una variabilidad en la sensibilidad según el antígeno de *A. simplex* s.l. empleado para estimular los basófilos: extracto crudo (90%), rAni s 1 (96,7%) y rAni s 3 (6,4%). Otros autores evaluaron los niveles de respuesta de los basófilos en el tiempo, en concreto, en una paciente que sufrió cuadros anafilácticos recurrentes asociados a *A. simplex* s.l., encontrando que la respuesta persistía (89% activados) tras 11 años del diagnóstico inicial (Audicana *et al.*, 1995; Audicana y Kennedy, 2008).

3.2.2 Test de liberación de histamina

Esta prueba consiste en explorar la habilidad de las células efectoras de generar mediadores *in vitro*, que pueden ser liberados mediante mecanismos dependientes o no de IgE (Vervloet *et al.*, 1983; Demoly *et al.*, 2003). Presenta varios inconvenientes debido a que la capacidad de liberación de histamina depende de muchos factores y citoquinas, además de que una parte de la población tienen basófilos no liberadores; es por ello que es un test de utilidad limitada en la práctica clínica (Dahinden *et al.*, 1989; Bischoff *et al.*, 1990; Kurimoto *et al.*, 1991; Dahinden *et al.*, 1991; Moneo *et al.*, 1993; Torres *et al.*, 2013). Así mismo, en un estudio realizado por Del Pozo *et al.* (1996), el 70% de los pacientes con síntomas de anafilaxia tras ingesta de pescado y pruebas cutáneas e IgE anti-*A. simplex* s.l. positiva, resultaron positivos con la prueba de liberación de histamina, al emplear extracto crudo de *A. simplex* s.l.

3.2.3 RAST y FEIA

Fue descrita en el año 1967 por Wide *et al.*, como una prueba *in vitro* para la detección cuantitativa de anticuerpos contra alérgenos. Se fundamenta en la unión de alérgenos, de forma covalente, a una fase sólida de polisacáridos activados mediante una reacción con bromuro de cianógeno. Incluye un primer paso en el cual los alérgenos, que se encuentran en la fase sólida, reaccionan con el suero del paciente y, por lo tanto, con los anticuerpos específicos contra los alérgenos. Después de varios lavados, el complejo antígeno-anticuerpo reacciona con un anticuerpo anti-IgE marcado radioactivamente. La radioactividad del complejo se mide mediante un contador gamma (Adkinson, 1980). Esta técnica fue comercializada por Pharmacia Diagnostics AB, (Uppsala, Sweden), en 1970 para su uso en diagnóstico. Se empleó para la detección de anticuerpos IgE frente a *A. simplex*, siendo un ejemplo de ello, el ensayo realizado por Desowitz *et al.* (1985). Estos autores compararon la utilidad de la técnica RAST y contraelectroforesis (CEP) para el diagnóstico de cinco pacientes con diagnóstico (cuatro confirmados y otro con sospecha) de anisakiosis, comprobando que todos fueron positivos por RAST y negativos por CEP. Realizaron el RAST con antígenos crudos tanto de *A. simplex* como de *T. canis* verificando ausencia de reactividad con este último. Sin embargo, los sueros de pacientes aquejados de otras helmintosis sí reaccionaron con ambos antígenos. Esta técnica en su versión original está en desuso y ha sido sustituida por técnicas no radiactivas, fundamentalmente por inmunoensayos enzimáticos con sustratos fluorescentes (FEIA) como el inmunoCAP, en la que además se reemplazó el disco antiguo de papel por una nueva fase sólida, comercializada en sus inicios por Pharmacia. Las compañías siguieron las recomendaciones del National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIH) que, en el 2010, recomendó sustituir las pruebas de detección de IgE específica con radiactividad por pruebas con sistemas de detección fluoroenzimáticos. Esta técnica y sus desarrollos tecnológicos posteriores (ImmunoCAP- ISAC, Phadia 2500 y Phadia 5000, etc.) ahora comercializados por Thermo Fisher Scientific se utilizan ampliamente en los Servicios de Alergia del Sistema Nacional de Salud (SNS) español.

Esta metodología, como el ImmunoCAP, en el caso de *Anisakis* spp. ofrece alta sensibilidad, pero baja especificidad, al utilizar un antígeno crudo purificado y no diferenciar anticuerpos IgE frente a otras patologías relacionados (50% especificidad) (Lorenzo *et al.*, 2000). Algunos autores proponen una asociación entre los niveles más bajos de IgE específica (clases 1 y 2 del CAP) con sensibilización asintomática y los niveles más altos (CAP 4 o superiores) relacionados con procesos alérgicos tras la infección con la larva 3 de *A. simplex* s.l. (Caballero *et al.*, 2013).

3.2.4 Inmunotransferencia

La metodología fue descrita en 1979, también se le conoce como *western blotting*, y consiste en la separación electroforética de proteínas en un gel de poliacrilamida y posterior transferencia de las mismas a una membrana de nitrocelulosa o polifluoruro de vinilideno (PVDF).

Una vez separadas las proteínas, en función de su peso molecular, y trasladadas a un soporte adecuado, podrán ser reconocidas por los anticuerpos de los sueros de los pacientes.

Actualmente casi todos los ensayos que aplican esta técnica para el diagnóstico de las enfermedades alérgicas asociadas a *Anisakis* spp., detectan anticuerpos IgE. En un estudio realizado por Del Pozo *et al.* (1996) encontraron que, empleando *western blotting* para la detección de anticuerpos IgE, en pacientes con anisakiosis, obtenían una alta sensibilidad y especificidad. Estos parámetros disminuían al usar un *western blotting* IgG, debido a reacciones cruzadas, resultados positivos, con los grupos controles.

Respecto a los antígenos utilizados en el procedimiento, estos han ido variando en el tiempo, en paralelo al empleo de protocolos de purificación bioquímica y metodología molecular. En sus inicios, la técnica usó productos de ES de la larva 3 de *A. simplex* s.l., incluso extractos crudos; hoy en día la mayoría de los test diagnósticos, que se basan en la inmunotransferencia, utilizan diversos antígenos recombinantes, tales como Ani s 1, Ani s 4, Ani s 5, Ani s 9 y Ani s 10, con diferentes resultados de sensibilidad y especificidad según las características del antígeno empleado (Arrieta *et al.*, 2000; Asturias *et al.*, 2000; Shimakura *et al.*, 2004; Moneo *et al.*, 2005; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2007; Del Rey-Moreno *et al.*, 2008; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2008; Caballero *et al.*, 2008; Caballero *et al.*, 2011).

3.2.5 ELISA

Su uso fue publicado por primera vez por Engvall y Perlmann en el año 1971. A partir de esa fecha, y debido al impacto clínico generado por ser un procedimiento no radioactivo, se comenzó a utilizar como rutina en una infinidad de determinaciones analíticas (Lequin, 2005).

Al igual que con el *western blotting*, en las determinaciones que aplican la técnica ELISA para el diagnóstico de los procesos alérgicos asociados a *Anisakis*, mayoritariamente se detectan anticuerpos IgE. Sin embargo, la evaluación de otras clases de inmunoglobulinas también es útil. Así se propuso la utilización del isotipo IgG4 como marcador de los diferentes fenotipos de enfermedades alérgicas asociadas a *Anisakis* spp. Se demostró que los niveles de IgE e IgG4 anti-Ani s 1 y anti-Ani s 7 eran más elevados en el grupo de los pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA) que en el grupo de los pacientes diagnosticados de urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* spp. (UC+) (Daschner *et al.*, 2014).

Se han empleado distintos tipos de ELISA, sobre todo indirecto y de captura. En este último caso, cabe destacar el sistema desarrollado por Lorenzo *et al.* (2000), mediante el uso del anticuerpo monoclonal (AcM) UA3. En la última década se han utilizado con frecuencia ELISAs indirectos con alérgenos recombinantes. La mayor o menor sensibilidad de la técnica recae, principalmente, en las características intrínsecas de los alérgenos empleados. La combinación de

alergenos principales como el Ani s 1 y Ani s 7 en un sistema ELISA de detección único, mejora la sensibilidad y la especificidad del método (Anadón *et al.*, 2010).

3.2.6 Microarrays

Otra técnica aplicada para el diagnóstico de la anisakiosis son los microarrays o micromatrices basados en la tecnología de los biochips. El Test ISAC® (Immuno Solid-phase Allergen Chip; Thermo Fisher Scientific Inc.) es un ejemplo de ello y se basa en un inmunoensayo de fase sólida semi-cuantitativo en un formato de microarray. Las muestras de suero o plasma humano se incuban para detectar anticuerpos IgE específicos, frente a 112 proteínas alergénicas presentes en más de 50 alergenitos diferentes. La unión de los anticuerpos IgE específicos a los componentes alergenitos inmovilizados se detecta añadiendo un anticuerpo anti-IgE humano marcado mediante fluorescencia secundaria. El proceso sigue con la adquisición de imágenes utilizando un escáner adecuado para el microarray. En un estudio de Martínez-Aranguren *et al.* (2014) en el cual realizaban la determinación de IgE específico, frente entre otros a Ani s 1 de *A. simplex* s.l., utilizando ISAC 112 y ELISA, obtuvieron una sensibilidad del 100% y una especificidad del 96,1% utilizando ISAC 112 y 92,2% con la técnica de ELISA, obteniendo mejores resultados que los obtenidos con este recombinante previamente por Caballero *et al.*, 2012 y Cuéllar *et al.*, 2012, con este mismo alergenito recombinante.

4. Alergenitos descritos en *A. simplex* s.l.

En los últimos años, se han llevado a cabo la descripción de 14 alergenitos de *A. simplex* s.l., con mayor o menor utilidad para el diagnóstico de la enfermedad según sus características. Estos alergenitos han sido anotados siguiendo las recomendaciones de la *International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS) Allergen Nomenclature Sub-Committee* y sus características principales se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Características moleculares principales de los alergenitos descritos en *A. simplex* s.l.

Alergenito	Nombre común	Pm (kDa)	Función biológica (Gene Ontology)	Alergenitos/Moléculas relacionadas	Dominios conservados	Número de acceso a UniProt	Ref.
Ani s 1	Ani s 1	24	Desconocida	-Similitud con alergenitos/moléculas descritas en: <i>A. pegreffii</i> , <i>Ascaris</i> spp., <i>Toxocara canis</i> , <i>Onchocerca volvulus</i> , <i>Lucilia cuprina</i> , <i>Glossina pallidipes</i> , <i>Stomoxys calcitrans</i>	-Dominio Kunitz, característico de la familia BPTI/Kunitz de inhibidores de serin-proteasas (cd00109) -Estructura con plegamiento alfa+beta, rica en puentes disulfuro -Modelo estructural: BPTI (inhibidor de tripsina pancreática bovina)	L7V3Q3	Moneo <i>et al.</i> , 2000

Ani s 2	Paramiosina (Panalergeno)	97	-Actividad motora -Complejo de miosina	-Similitud con alergen/moléculas descritas en: <i>A. pegreffii</i> , <i>Ascaris</i> spp., <i>T. canis</i> , <i>Caenorhabditis elegans</i> , <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> , <i>Syphacia muris</i> , <i>Brugia pahangi</i> , <i>O. volvulus</i> , <i>Brugia malayi</i> , <i>Wuchereria bancrofti</i>	-Miosina_cola_1 PF01576 7 fragmentos con estructura hélice (hélice superenrollada), estructura secundaria compuesta por 2 o más alfa-hélices para formar estructura superenrollada ("Coiled coil [KW-0175]")	L7V1I9	Pérez-Pérez <i>et al.</i> , 2000
Ani s 3	Tropomiosina (Panalergeno)	41	-Regulación de la contracción muscular, mediante interacción con troponina y actina	-Similitud con alergen/moléculas descritas en: <i>Caenorhabditis</i> spp., <i>Ascaris</i> spp., <i>Trichostrongylus colubriformis</i> , <i>Acanthocheilonema viteae</i> , <i>O. volvulus</i> , <i>S. muris</i> , <i>Drosophila</i> spp., <i>Bactrocera</i> spp., <i>Amyelois transitella</i> , <i>Musca domestica</i>	-Estructura PF00261. Proteína alfa-helicoidal, con estructura superenrollada de dos hélices paralelas con sitios de unión para actina. La secuencia presenta repeticiones de 7 residuos	Q9NAS5	Asturias <i>et al.</i> , 2000-a
Ani s 4	Ani s 4	9	-Cistatina, inhibidor de cistein-endopeptidasa -Regula la actividad cistein proteasa mediante hidrólisis de enlaces peptídicos por interacción con el grupo sulfidrido de cisteína	No descritas de momento	-Dominio tipo cistatina cd00042 o familia de inhibidores de cistein proteasas, que principalmente se presentan como proteínas de dominio único	Q14QT4 (IPR027214. Cistatina. IPR000010. Cistatin_dom)	Moneo <i>et al.</i> , 2005
Ani s 5	Ani s 5	15	SXP/RAL-2 es una familia de proteínas característica de nematodos. De función desconocida, presenta propiedades inmunogénicas en los hospedadores	-Similitud con alergen/moléculas descritas en: <i>T. canis</i> , <i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>Baylisascaris schroederi</i>	-PF02520/DUF148 dominio de función desconocida (IPR003677)	A1IKL2	Kobayashi <i>et al.</i> , 2007-a
Ani s 6	Ani s 6	9,7	Inhibidor de serin-proteasas	No descritas de momento	-Dominio que contiene 10 cisteínas (PF01826)	A1IKL3	Kobayashi <i>et al.</i> , 2007-a
Ani s 7	Ani s 7	139	-	No descritas de momento	-Sin dominios conservados -Abundantes cisteínas distribuidas en 19 fragmentos homólogos (CX ₁₇₋₂₅ CX ₉₋₂₂ CX ₈ CX ₆) ordenados en tandem, con las mayores homologías en las secuencias -CX ₈ -	A9XBJ8	Rodríguez <i>et al.</i> , 2008

Ani s 8	Ani s 8	15	-SXP/RAL-2 es una familia de proteínas característica de nematodos -De función desconocida, presenta propiedades inmunogénicas en los hospedadores	No descritas de momento	PF02520/DUF148 Dominio de función desconocida (IPR003677)	A7M6S9	Kobayashi <i>et al.</i> , 2007-b
Ani s 9	SXP/RAL-2	14	-SXP/RAL-2 es una familia de proteínas característica de nematodos -De función desconocida, presenta propiedades inmunogénicas en los hospedadores	No descritas de momento	PF02520/DUF148	B2XCP1	Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> , 2008
Ani s 10	Ani s 10	21	Desconocida	No descritas de momento	Desconocido	D2K835	Caballero <i>et al.</i> , 2011
Ani s 11	Ani s 11	27	Desconocida	No descritas de momento	Desconocido	E9RFF3	Kobayashi <i>et al.</i> , 2011
Ani s 12	Ani s 12	31	Desconocida	No descritas de momento	Desconocido	L7V0K0	Kobayashi <i>et al.</i> , 2011
Ani s 13	Hemoglobina	30	-Unión grupo hemo - Unión a oxígeno -Transportador	-Similitud con hemoglobina y/o globina de: <i>A. pegreffii</i> , <i>Ascaris</i> spp., <i>Fundulus heteroclitus</i> , <i>Pseudoterranova decipiens</i>	Globina PF00042	K9USK2	Gonzalez-Fernández <i>et al.</i> , 2015
Ani s 14	Ani s 14	23,5	Desconocido	Homólogo de Tcan_03789 de <i>T. canis</i>	Desconocido	A0A0S3Q267	Kobayashi <i>et al.</i> , 2015

4.1 Ani s 1

Es un alérgeno principal de *A. simplex* s.l. inicialmente se describió como una molécula de la larva 3, de 24 kDa purificada en su forma nativa, reconocida por IgE específicas de más del 85% de pacientes con síntomas de infección por dicho nematodo (Moneo *et al.*, 2000). Se confirmó experimentalmente que se trata de una proteína de ES (gránulo secretor de glándula excretora, ocasionalmente en el revestimiento del canal excretor principal del parásito) (Gómez-Aguado *et al.*, 2003), codificada por un gen que expresa un polipéptido de 194 residuos con un peso molecular estimado de 21 kDa (Shimakura *et al.*, 2004). Es termoestable y presenta un dominio kunitz típico de la familia de inhibidores de endopeptidasas del tipo serin-proteasas (Shimakura *et al.*, 2004). Rodríguez-Pérez *et al.* (2007) comprueban que la expresión de Ani s 1 en células eucariotas (*Pichia pastoris*) permite producir un recombinante que mantiene las propiedades alérgicas previamente descritas para el alérgeno nativo. Existen evidencias de que Ani s 1 tiene diferentes isoformas, y se han descrito genes homólogos en *A. pegreffii* (Shimakura *et al.*, 2004; Quiazon *et al.*, 2013).

Arrieta *et al.* (2000) clonaron a partir de una colección de ADN complementarios (ADNc) del parásito un gen que codifica una proteína de 21 kDa, con gran homología con troponinas de nematodos, reconocida por las IgE específicas del 20% de los pacientes con síntomas alérgicos relacionados con *Anisakis* spp. (episodio alérgico tras ingesta de pescado, con pruebas cutáneas por *A. simplex* s.l. y negativas a pescados). La proteína recombinante incluye dominios EF característicos de proteínas de unión a calcio. Aunque identificada inicialmente como Ani s 1 (Arrieta *et al.*, 2000), algunos autores (Shimakura *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2008) la denominaron después como alérgeno 21 kDa o troponina-like, debido a las diferencias que presenta con el primer alérgeno mayor descrito en *Anisakis*; por ello, en el presente trabajo la identificaremos como alérgeno con similitud con troponina.

Con respecto a las propiedades diagnósticas de Ani s 1, Caballero y Moneo (2002) obtuvieron que el 86% de los pacientes con hipersensibilidad a *A. simplex* s.l. mostraban respuestas de IgE e IgG anti-Ani s 1; además, los autores encontraron que el 86% de pacientes con anisakiosis intestinal tenían niveles elevados de IgE específica mientras que solo el 29% presentaban niveles de IgG más altos que los correspondientes controles. Por otro lado, Cuellar *et al.* (2012) determinaron que el 82,1% de los pacientes aquejados de anisakiosis gastroalérgica, en comparación con el 42,5% de pacientes con urticaria crónica asociada a sensibilización por *A. simplex* s.l., reconocían el alérgeno Ani s 1, mientras que los mismos individuos reaccionaban mayoritariamente con el alérgeno Ani s 7 (ver apartado Ani s 7), un 92,9% y 92,5% respectivamente; además, los autores concluyeron que la utilización combinada de los alérgenos Ani s 1 y Ani s 7 rendía una sensibilidad y especificidad del 100%. También Caballero y colaboradores (Caballero *et al.*, 2012) demostraron la mejora de la especificidad de las pruebas diagnósticas de alergias producidas por *A. simplex* s.l. al utilizar varios alérgenos recombinantes combinados, entre ellos Ani s 1, sin menoscabo de la sensibilidad de los ensayos. Más recientemente (Martínez-Aranguren *et al.*, 2014), utilizando Ani s 1, en diferentes formatos/plataformas de ensayos inmunodiagnósticos *in vivo* e *in vitro*, confirmaron la relevancia del alérgeno recombinante en el diagnóstico de alergias inducidas por *A. simplex* s.l. tras ingesta de pescado al ser reconocido por el 100% de los pacientes.

Por otra parte, se investigó la duración de la sensibilización (niveles IgE específicas anti-*A. simplex* s.l.) contra el nematodo, o sus productos, en pacientes alérgicos, mediante diseño de estudios longitudinales de evaluación de niveles de IgE frente al alérgeno parasitario en estudio, entre otros. Anadón *et al.* (2010) encontraron, en un periodo de 6-38 meses después del comienzo de los síntomas, que las respuestas IgE anti-Ani s 1 persistían durante más tiempo (> 38 meses) que las evaluadas contra Ani s 7 (ver apartado Ani s 7), y que dichas diferencias en perfil de reconocimiento se podían emplear para distinguir infecciones recientes de antiguas. En otro trabajo similar, se analizó esta misma respuesta contra los alérgenos Ani s 1 y Ani s 4 (ver apartado Ani s 4), detectando niveles de IgE específicas en algunos pacientes con alergia a *A. simplex* s.l. después de 8 años del episodio alérgico y observando que dicha respuesta puede incrementarse ante la nueva exposición de los individuos al alérgeno de anisákidos. Además, determinaron que el

reconocimiento anti-Ani s 1 se mantuvo hasta 118 meses después de la aparición de los síntomas en algunos pacientes (Carballeda-Sangiao *et al.*, 2016-a). Estos estudios han permitido concluir que Ani s 1 es una herramienta útil para detectar infecciones tanto recientes como crónicas producidas por el nematodo y que los alérgenos de *Anisakis* inducen respuestas IgE de larga duración.

Finalmente indicar que se realizaron varios estudios sobre la caracterización de los principales epitopos de Ani s 1 reconocidos por IgE específicas de pacientes con anisakiosis. Kobayashi *et al.* (2010), mediante el empleo de 32 péptidos solapantes, determinaron que los principales epitopos de unión de IgE se localizaban en ciertos residuos de los péptidos P24 (aminoácido 116–130) y P28 (aminoácido 136–150), que mediaban la unión a través de interacciones hidrostáticas e hidrofóbicas con la inmunoglobulina. En este sentido, en España se realizó un estudio para conocer los epitopos específicos de Ani s 1 reconocidos por células T y B (IgE e IgG4) de pacientes españoles con anisakiosis alérgica; se determinó que los epitopos T inmunodominantes, localizados en el extremo carboxilo terminal, eran distintos de los B, que a su vez eran mayoritariamente los mismos para IgE e IgG4 (García-Alonso *et al.*, 2015).

4.2 Ani s 2

Es un alérgeno principal de *A. simplex* s.l., obtenido mediante cribado de una genoteca de expresión de larvas 3 del nematodo con una mezcla de sueros de pacientes con alto título de IgE anti-*A. simplex*. La secuenciación de un clon purificado y positivo en el inmunocribado puso de manifiesto que Ani s 2, con 3.200 nucleótidos, era paramiosina con 869 residuos aminoacídicos y un peso molecular aproximado de 100 kDa. El alérgeno mostró una estructura (α hélice enrollada) y composición semejante a las paramiosinas descritas en otros nematodos, con similitudes del 89% en el caso de paramiosina de *Onchocerca volvulus* y del 87% con la de *Caenorhabditis elegans* (Pérez-Pérez *et al.*, 2000). La proteína recombinante, expresada en el vector pMALc2, presentó un bajo reconocimiento por parte de los sueros de individuos con anisakiosis confirmada (23%), en contraposición a la proteína nativa, paramiosina purificada por procedimientos bioquímicos clásicos, que fue reconocida por el 88% de los mismos sueros. También se encontró la secuencia de este alérgeno en *A. pegreffii*, caracterizada por su alta similitud con la de Ani s 2 (Quiazon *et al.*, 2013), y por compartir epitopos y motivos de unión a IgE y antígeno leucocitario humano (HLA) (Kobayashi *et al.*, 2010; Guarneri *et al.*, 2007). Dichos hallazgos sugieren que la paramiosina de ambas especies supondría un riesgo similar para desencadenar alergias en humanos tras su consumo accidental de pescado infectado.

La paramiosina es un antígeno somático, componente del músculo de invertebrados; su naturaleza conservada en los diferentes organismos (crustáceos, ácaros) determina su consideración como panalérgeno, y favorece la aparición de reacciones cruzadas inmunológicas y moleculares con las proteínas homólogas de otras especies, e incluso con otros alérgenos del mismo parásito como Ani s 3 (tropomiosina) que a continuación se describe (Guarneri *et al.*, 2007; Nieuwenhuizen *et al.*, 2013). En el apartado 4.3 se explicará conjuntamente la problemática citada.

4.3. Ani s 3

Conocida también como tropomiosina de *A. simplex* (Asturias *et al.*, 2000-a). Es un componente somático del nematodo, termoestable, que pertenece a una familia de proteínas estrechamente relacionadas, presentes especialmente en células musculares. La tropomiosina tiene múltiples isoformas, características de tipos específicos de tejidos. La isoforma común presenta 32,5 kDa, estructura α hélice enrollada y es abundante en músculo, donde como dímeros forma filamentos enrollados en estrecha asociación a lo largo del filamento de actina, siendo clave en el funcionamiento muscular bajo control de calcio y troponinas (Sereda *et al.*, 2008). La tropomiosina es un panalergeno de invertebrados (Reese *et al.*, 1999).

El gen de una isoforma de tropomiosina de *A. simplex* s.l. (As-TPM) fue clonado por Asturias *et al.* (2000-a), caracterizado por tener 855 nt que expresaban un polipéptido de 282 residuos aminoacídicos con los dominios característicos de estas proteínas. A nivel de secuencia, la molécula mostró una gran similitud con tropomiosinas descritas en otros nematodos, y menos con las de otros invertebrados (crustáceos, insectos, moluscos); en cualquier caso, hay que destacar que las tropomiosinas en general exhiben una estructura tridimensional muy conservada, que explicaría la supuesta reactividad cruzada inmunológica entre *Anisakis* spp. y algunas especies de invertebrados (Pascual *et al.*, 1997). La proteína madura mostró alrededor de 42 kDa. Asturias *et al.* (2000-b) sugirieron, al evaluar sus propiedades diagnósticas con una serie de pacientes con distintas formas de anisakiosis, que no era un alérgeno importante en *Anisakis* spp.

Más adelante, teniendo en cuenta la naturaleza conservada de la tropomiosina, y las observaciones realizadas por diversos autores, se estudió Ani s 3, junto con Ani s 2, como las causas principales de la reactividad cruzada entre *Anisakis* spp. y otros invertebrados. Así, Guarneri *et al.* (2007) analizaron “in silico” las homologías entre Ani s 3 y las tropomiosinas de 16 especies de invertebrados, encontrando similitud significativa en ciertos segmentos de las moléculas; resultados parecidos se obtuvieron al comparar Ani s 2 y sus homólogos de las especies estudiadas. Además, identificaron epitopos del dominio de unión HLA DRB1*0404, del complejo mayor de histocompatibilidad humano, en Ani s 2 y Ani s 3, que a su vez estaban compartidos con las paramiosinas y tropomiosinas de los invertebrados estudiados. Los autores postulan que todos estos hallazgos en los alérgenos de *A. simplex* s.l. y moléculas homólogas de invertebrados podrían explicar las reacciones cruzadas observadas entre ellos.

4.4 Ani s 4

El alérgeno Ani s 4 fue reportado por Moneo *et al.* (2005) tras su purificación como proteína termoestable a partir de un extracto crudo del parásito, que fue incubado en un baño de agua hirviendo durante 30 min, después fraccionado por tratamientos con etanol y purificado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa. Se observó que el producto

resultante contenía un alérgeno de bajo peso molecular que mantenía los epitopos IgE, tras ser sometido a unos tratamientos tan drásticos, y que podía estar relacionado con algunas formas clínicas de la anisakiosis. Ani s 4 era una proteína glicosilada de la fracción de ES del parásito. El alérgeno fue reconocido por el 27% de individuos sensibilizados frente a *A. simplex* s.l. Por ello, a pesar de no poderlo clasificar como alérgeno principal se propuso su uso para la detección de pacientes con características clínicas diferenciales, ya que Ani s 4 era especialmente reconocido por aquellos individuos que padecieron episodios anafilácticos en comparación con los que no mostraban dichos episodios.

Más tarde, se clonó el correspondiente gen mediante cribado de una genoteca de expresión de larvas 3 de *A. simplex* s.l., confirmándose que expresaba una proteína con un peso molecular deducido de 12,7 kDa, compuesta por 115 aminoácidos de los que los 21 primeros formaban parte del péptido señal no incluido en la proteína madura (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2007). Al comparar su secuencia en los bancos de datos, se determinó su similitud con la familia 2 de cistatinas descritas en otros nematodos; en este sentido, se demostró que rAni s 4 era una cistatina funcionalmente activa ya que inhibió la actividad de la papaína, una cistein proteínasa. También se concluyó que la molécula recombinante mantenía las propiedades alérgicas de la molécula madura, siendo igualmente reconocida por IgE de algunos pacientes con hipersensibilidad a *A. simplex* s.l. (IgE específica positiva para *A. simplex* s.l., negativa para contra peces e historia clínica compatible con infección por *A. simplex* s.l.); además, rAni s 4 medió la activación de basófilos de pacientes sensibilizados frente a *A. simplex* s.l. En experimentos de inmunolocalización, Rodríguez-Mahillo *et al.* (2007) apreciaron que Ani s 4, era un producto de ES que se localizaba mayoritariamente en la glándula excretora de la larva 3 de *Anisakis*, y en la capa basal de la cutícula. Poco después, se identificó una isoforma de que sólo difería de rAni s 4 en un residuo aminoacídico pero con diferentes propiedades alérgicas: diferente capacidad de unión a IgE y potencial para inducir la activación de basófilos (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008).

4.5 Ani s 5

Alérgeno termoestable, de 15 kDa en su forma nativa. Se clonó por inmunocribado de una genoteca de expresión de larvas 3 de *A. simplex*; el ADNc presentó 465 nt que expresaba un polipéptido de 152 aminoácidos, con un péptido señal de 18 residuos. Estudios de homología con los bancos de datos pusieron de manifiesto que Ani s 5 era miembro de la familia de proteínas SXP/RAL-2, con similitud significativa con moléculas homólogas descritas en otros nematodos tales como *A. suum*, *Wuchereria bancrofti* y *O. volvulus*. No se consideró un alérgeno principal ya que fue reconocido por el 25% de los pacientes con clínica de reacciones alérgicas frente a *A. simplex* (Kobayashi *et al.*, 2007-a).

Después, Caballero *et al.* (2008) purificaron el alérgeno nativo, confirmando su naturaleza secretora y localizando su expresión en la glándula excretora, ventrículo, y superficie luminal del epitelio intestinal del parásito; además la molécula era reconocida por las IgE del 49%

de los pacientes que estudiaron, pacientes que por otra parte no reaccionaban con Ani s 1 y Ani s 4, por lo que los autores postularon su interés diagnóstico. Más adelante, en un trabajo sobre su estructura tridimensional, se determinó que presentaba características semejantes a calmodulina, pero con unión a iones de magnesio, en lugar de iones de calcio. También se analizó las propiedades de los epitopos IgE e IgG4 de unión de la molécula, mediante *microarrays* con péptidos solapantes de 20 aminoácidos y membranas SPOT con péptidos solapantes de 12 residuos, concluyendo que Ani s 5 contenía 11 epitopos IgE en su superficie, y que estas secuencias eran prácticamente idénticas en el caso de los epitopos reconocidos por IgG4 (García-Mayoral *et al.*, 2014).

4.6 Ani s 6

Alergeno no principal de *A. simplex*, obtenido por inmunocribado de una genoteca de expresión de larvas 3 del parásito con mezcla de sueros de pacientes con historia de reacciones alérgicas, tales como urticaria o anafilaxia tras la ingesta de pescado crudo o poco cocinado (Kobayashi *et al.*, 2007-a).

El ADNc clonado presentó 522 nt, con un marco de lectura abierto de 252 nt que expresó un polipéptido de 84 residuos; por análisis bioinformático se determinó que los primeros 22 aminoácidos podían formar parte del péptido señal apoyando su naturaleza secretora. Mediante comparación con los bancos de datos, se observó que Ani s 6 mostraba alta identidad de secuencia con inhibidores de serin proteasas descritas en otros organismos, especialmente artrópodos; las mayores similitudes se encontraron con inhibidores tanto de quimotripsina como de tripsina, con un dominio rico en cisteínas en posiciones del 25-79 del alergen. Todo ello apuntó a que Ani s 6 pertenecía a la familia de los inhibidores de serin proteasas, comprobándose su actividad inhibitoria sobre α -quimotripsina, en una manera dosis-dependiente, aunque no exhibió inhibición contra tripsina. Se dedujo que Ani s 6 estaba poco representada en el extracto crudo de *A. simplex* en los análisis de western blot llevados a cabo con dichos extractos. Para terminar, hay que destacar que Ani s 6 fue termoestable, resistente a la acción de la pepsina, siendo reconocida por el 18% de pacientes alérgicos por lo que fue considerada como un alergen menor (Kobayashi *et al.*, 2007-a).

4.7 Ani s 7

Ani s 7 se define como un alergen principal de *A. simplex*, reacciona con el 100% de los pacientes sensibilizados contra *Anisakis* (Rodríguez *et al.*, 2008). La caracterización de este alergen comienza en estudios previos en los que se determinó que la molécula nativa era reconocida por IgE específicas de pacientes japoneses con anisakiosis, en un ensayo de captura que empleaba antígeno total deglicosilado del nematodo y el AcM UA3 (epitopo-específico del alergen Ani s 7); dicho procedimiento demostró ser 100% sensible y específico para el serodiagnóstico de pacientes españoles con síntomas de alergia producidos por el parásito (Lorenzo *et al.*, 1999). Dada su importancia, Rodríguez *et al.* (2008) clonaron parte del gen

mediante el cribado de una genoteca de ADNc de larvas 3 de *A. simplex* con el AcM UA3; se obtuvo una secuencia que expresaba un polipéptido de 1096 aminoácidos con abundantes cisteínas (7,3%), entre los residuos más representados. Al realizar estudios de similitud en los bancos de datos, no se encontró homología significativa con las moléculas depositadas; si se determinó que contenía 7 segmentos de 6 aminoácidos contiguos que coincidían con las secuencias proteicas de alergenitos conocidos (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Cryptomeria japonica*, *Aedes aegypti*, *Homo sapiens*, *Triticum aestivum*, *Prunus avium*, *Malus domestica*). Al estudiar la estructura más detenidamente, se confirmó que las cisteínas aparecían espaciadas a intervalos regulares, dispuestas en 19 fragmentos homólogos (CX₁₇₋₂₅CX₉₋₂₂CX₈CX₆) ordenados en tándem, apreciándose las mayores homologías en las secuencias -CX₈- de la molécula, con el fragmento -QCVQKYGTEFCKK- como la repetición más conservada. De la secuencia rAni s 7, se seleccionó una región antigénica de 279 residuos (tAni s 7) para su subclonación en vectores de expresión; la proteína recombinante obtenida mostró idéntica alergenicidad que el correspondiente alergenito nativo y las mismas propiedades diagnósticas que el ensayo de captura con antígenos crudos deglicosilados de *A. simplex* s.l. y el AcM UA3 previamente descrito por Lorenzo *et al.* (1999). Por otra parte, los autores disecaron el motivo/epitopo de Ani s 7 reconocido por UA3, un epitopo lineal (P3L, P3) que se sugiere pueda ser el epitopo alergénico más relevante. Después, en un estudio experimental, Anadón *et al.* (2009) encontraron que el producto recombinante tAni s 7, y por extensión rAni s 7, era específico del género *Anisakis* spp. y podía considerarse como marcador de una infección real por *Anisakis* spp. (sólo se detecta en inoculaciones experimentales con larvas vivas del nematodo).

En los últimos años, se ha venido empleando el recombinante Ani s 7 para el diagnóstico de los diferentes fenotipos clínicos asociados a la infección por *Anisakis*, bien sólo o asociado con otros alergenitos como Ani s 1. En este sentido, Anadón *et al.* (2010) evaluaron el alcance diagnóstico y clínico de los dos alergenitos en comparación con el ensayo comercial CAP FEIA, mediante el empleo de 495 sueros de pacientes alérgicos y 25 de pacientes con alergias no relacionadas con alimentos como controles; también estudiaron el descenso de anticuerpos específicos IgE en 15 pacientes en un experimento longitudinal, durante un periodo de 6 a 38 meses. Los resultados del estudio pusieron de manifiesto que CAP FEIA clasificaba el 25% de sueros como falsos positivos, mientras que eran negativos en ELISA con Ani s 1 y Ani s 7, y rendía un 1,8% de falsos negativos también en comparación con los ELISAs con los recombinantes; por otra parte demostraron que las IgE específicas anti-Ani s 1 persistían durante más tiempo que las IgE anti-Ani s 7, siendo por tanto marcadores diferenciales de infecciones recientes *versus* infecciones antiguas, como ya se sugirió (Carballeda-Sangiao *et al.*, 2016-a). Con fines de identificación de diferentes fenotipos clínicos asociados a la infección por *Anisakis*, el mismo grupo de investigación, emplearon el alergenito recombinante tAni s 7 en combinación con el alergenito recombinante Ani s 1, para analizar las propiedades de ambas moléculas en el diagnóstico de anisakiosis gastroalérgica y urticaria crónica asociada con sensibilización a *A. simplex* s.l. (Cuéllar *et al.*, 2012). En el estudio se consideró inicialmente que el alergenito Ani s 7 sólo se libera cuando la larva infectante se mantiene viva. Tras evaluar serológicamente los pacientes de los grupos clínicos indicados, se

encontró que Ani s 1 y Ani s 7 son muy buenos reactivos diagnósticos, con diferente sensibilidad diagnóstica según las formas clínicas, siendo mayor la exhibida por Ani s 7; además, ante los resultados obtenidos, los autores sugirieron que la mayoría de los casos de urticaria crónica parece que se derivan de infecciones parasitarias previas, atendiendo al reconocimiento observado de Ani s 7. También en el análisis diferencial de las dos patologías, Daschner *et al.* (2014) evaluaron el reconocimiento de Ani s 1 y Ani s 7 por inmunoglobulinas IgE e IgG4 de pacientes de ambos grupos, y relacionaron dicho reconocimiento con las posibles propiedades protectoras *versus* patogénicas de los dos anticuerpos.

4.8 Ani s 8

Es un alergeno termoestable de 15 kDa en su forma nativa, obtenido por purificación bioquímica de un extracto crudo de larvas 3 de *A. simplex* s.l. tratado en baño de agua hirviendo, durante 10 min (Kobayashi *et al.*, 2007-b). La molécula purificada fue reconocida por el suero de 7 de los 28 pacientes con anisakiosis estudiados (sensibilidad 25%).

En el mismo trabajo Kobayashi *et al.* (2007-b) clonaron el gen que expresa Ani s 8, utilizando primero amplificación genómica con cebadores degenerados derivados de la secuencia de péptidos internos de la molécula y después ya cebadores específicos que permitieron obtener 32 tipos de ADNc de Ani s 8 (747-963 nt), cuyo marco abierto de lectura estuvo compuesto por 450 nt que codificaban 150 aminoácidos. En total se determinaron 10 isoformas del alergeno; la isoforma 1 era codificada por 23 de los ADNc por lo que se dedujo que era la isoforma mayoritaria de Ani s 8. Todas las moléculas presentaban un péptido señal, de acuerdo al programa *SignalP analysis*.

Al estudiar su homología con moléculas depositadas en los bancos de datos, se determinó que Ani s 8 era un miembro de la familia SXP/RAL-2, ya descrita en otros nematodos e incluso en *A. simplex* (alergeno Ani s 5); la identidad de secuencia entre Ani s 5 y Ani s 8 fue del 35%. Esta similitud se puso de manifiesto en la reactividad cruzada observada entre los dos productos recombinantes al probarlos en pruebas de ELISA de inhibición, aunque se detectó alguna muestra que exclusivamente reconocía al alergeno Ani s 8.

4.9 Ani s 9

El alergeno Ani s 9 es un alergeno no principal, secretado, termoestable, con estructura característica de la familia de proteínas SXP/RAL (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2008).

Se clonó de manera accidental junto con el alergeno Ani s 5 (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2008). El ADNc se aisló parcialmente mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con cebadores degenerados y después se completó con PCR para la Amplificación Rápida de Extremos de cDNA (RACE-PCR); presentó un marco abierto de lectura de 444 nt, que codifica un polipéptido de 147 aminoácidos con posible péptido señal de 17 residuos. El estudio de similitud con otras

moléculas incluidas en los bancos de datos determinó que Ani s 9 era otro miembro de la familia SXP/RAL, con función todavía por descubrir. Como ya se ha revisado, *A. simplex* s.l. cuenta con otros alérgenos descritos de esta misma familia, Ani s 5 y Ani s 8. Ani s 9 mostró un 34% de identidad de secuencia con Ani s 5, y un suero de paciente que presentaba sensibilización única anti-Ani s 5 no reconoció Ani s 9; este dato preliminar sugirió la inexistencia de reacción cruzada entre Ani s 5 y Ani s 9. En relación con Ani s 8, la similitud fue del 35% pero se desconoce si existe reactividad cruzada entre estos alérgenos.

También Kobayashi *et al.* (2011) clonaron el alérgeno Ani s 9 utilizando una genoteca de expresión de las larvas 3 del nematodo y una herramienta de inmunocribado más sensible, detección por quimioluminiscencia de los clones reconocidos por IgE específicas. Más recientemente, Quiazon *et al.* (2013) reportaron la presencia de una molécula homóloga en *A. pegreffii*, con sustituciones en la secuencia nucleotídica pero idéntica secuencia aminoacídica.

El producto de expresión recombinante Ani s 9, al igual que la molécula nativa, fueron igualmente reconocidos por IgE específicas del suero de 5 de los 16 pacientes (13,8%) con anisakiosis (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2008).

En relación con su naturaleza secretora, se demostró su expresión en los productos ES, pero a niveles más bajos que en el extracto crudo, así como su naturaleza termoestable mediante protocolos estándar (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2008).

Por último, destacar que Ani s 9 fue el único alérgeno de *Anisakis* spp. inhibido por veneno de avispa, en un estudio realizado por Rodríguez-Pérez *et al.* (2014) sobre reacciones cruzadas entre alérgeno de *Anisakis* spp. y de veneno de avispa (*Vespula* spp.).

4.10 Ani s 10

El alérgeno Ani s 10 es un alérgeno de unos 22 kDa, reconocido por el 39% de los pacientes estudiados, termo-estable, con estructura única con 7 repeticiones de 29 aminoácidos, casi idénticas (Caballero *et al.*, 2011).

Se clonó por inmunocribado de una genoteca de expresión de larvas 3 de *A. simplex* con suero de un paciente con alergia por *Anisakis* spp. El ADNc Ani s 10 contenía un marco de lectura abierto de 696 nt, que codificaba un polipéptido de 231 aminoácidos, con un peso molecular teórico de 21,126 kDa. Presentó 7 repeticiones, de 29 aminoácidos cada una, que incluían lugares teóricos de corte enzimático (tripsina, pepsina), característica similar a la que presentan moléculas descritas en cucarachas (Pomes *et al.*, 1998). Ani s 10 no contenía motivos/dominios incluidos en las bases de datos de proteínas (PFAM y SMART), no mostró homología con otros alérgenos (SDAP) (Caballero *et al.*, 2011).

Diferentes experimentos sugirieron que Ani s 10 era un producto somático o de la cutícula del nematodo; este tipo de alérgeno se podrían exponer al sistema inmune del hospedador al morir la larva y desencadenar las respuestas alérgicas (Caballero *et al.*, 2011).

Se demostró que Ani s 10 era termoestable, manteniendo los epitopos anti-IgE tras someterse a altas temperaturas (Caballero *et al.*, 2011).

4.11 Ani s 11

Alérgeno descrito por Kobayashi *et al.* (2011), mediante la estrategia arriba descrita, inmunocribado de genoteca de expresión de las larvas 3 de *A. simplex* s.l. con quimioluminiscencia. Los autores describieron clones que expresaban las proteínas Ani s 11 y Ani s 11-like. Ani s 11 presentaba un ADNc de 1537 nt, y 11-like un ADNc de 985 nt, codificando proteínas de 207 y 160 residuos respectivamente, que se sugirió podrían localizarse en la superficie de la larva. Ani s 11 y Ani s 11-like mostraban secuencias aminoacídicas con alta identidad (78%), a pesar de la gran diferencia en peso molecular; las dos portaban posibles péptido señal y mostraban secuencias cortas repetidas, de 6-15 residuos, clasificadas en 6 tipos (A-F), de acuerdo a la similitud de secuencia. Al estudiar homologías con otras moléculas, y entre sí, se encontró que Ani s 10 era un homólogo de Ani s 11 (49%) y Ani s 11-like (43%), compartiendo algunas secuencias repetidas. Ani s 11 fue reconocido por aproximadamente el 50% de los sueros de pacientes con reacciones alérgicas (urticaria, angioedema, anafilaxia) inducidas por *Anisakis* spp.

Más recientemente, en un estudio de Carballada-Sangiao *et al.* (2016-b), en el que compararon las propiedades diagnósticas de Ani s 11-like, junto con los alérgenos Ani s 1, Ani s 4, y Ani s 5 recombinantes, pusieron de manifiesto que Ani s 11-like era reconocido por el 78% de los sueros de pacientes con alergias por *A. simplex* s.l., de los que el 13,5% sólo reconocían el mencionado alérgeno, mientras que el 84% reaccionaban con Ani s 1, y un 35% con Ani s 4 y Ani s 5. El alto reconocimiento de Ani s 11-like por los pacientes de estudio, determinó que se le identificara como un alérgeno mayor. Además, Carballada-Sangiao *et al.* (2016-b) demostraron que era un alérgeno termoestable al retener su reactividad específica con IgEs tras su ebullición durante 30 min; por otra parte, se confirmó su resistencia a digestión enzimática por pepsina, durante 120 min.

4.12 Ani s 12

Alérgeno descrito por Kobayashi *et al.* (2011), mediante la estrategia arriba descrita, inmunocribado de genoteca de expresión de las larvas 3 de *A. simplex* s.l. con quimioluminiscencia. Ani s 12 presentó un ADNc de 1129 nt, que expresó un polipéptido de 295 residuos con posible péptido señal.

Su secuencia aminoacídica deducida mostró una estructura caracterizada por 5 repeticiones en tándem con un motivo nuevo (CX₁₃₋₂₅CX₉CX_{7,8}CX₆), compuesto por 40-52 residuos;

aunque las repeticiones tenían 4 cisteínas a intervalos regulares, no se apreció similitud de secuencia entre las repeticiones. Además, aunque se intuía cierta semejanza con el alérgeno Ani s 7, tampoco se encontró homología estructural relevante entre las dos moléculas. Hay que destacar que se ha aislado un gen homólogo en *A. pegreffii*, con alta variabilidad de secuencia con respecto a *A. simplex* (Quiazon *et al.*, 2013).

Más recientemente, Kinoshita *et al.*, (2014) sugirieron que Ani s 12 podría tratarse de un antígeno mayor al descubrir que el alérgeno era reconocido por muestras de dos pacientes con anisakiasis.

4.13 Ani s 13

El alérgeno Ani s 13 es la hemoglobina de *Anisakis* s.l. (González-Fernández *et al.*, 2015). Es un alérgeno principal de *Anisakis*, que no mostró reactividad cruzada con la molécula homóloga de *Ascaris*. Ani s 13 fue reconocido por el 64,3% de los pacientes sensibilizados frente al nematodo, el 80,9% de pacientes con AGA y 47,8% de pacientes con UC+; también se apreció que en el grupo clínico de anisakiosis gastroalérgica, los pacientes mostraron niveles de IgG4 e IgE más altos que en los de UC+ y se sugirió que este perfil de reconocimiento diferencial hacían de Ani s 13 un posible marcador de las distintas fenotipos de alérgicos asociados a *Anisakis* spp. estudiados, como ya se había sugerido para Ani s 1 (Moneo *et al.*, 2000). Todo el planteamiento experimental se llevó a cabo con el empleo de un AcM (48Eg), preparado contra la hemoglobina de *A. pegreffii* teniendo en cuenta la alta similitud que se ha determinado entre las dos especies gemelas de *A. simplex* s.l.

González-Fernández *et al.* (2015) también realizaron un elegante estudio “in silico” para la predicción de epitopos IgE en la hemoglobina de *Anisakis*, mediante la comparación en 3D de la estructura de moléculas alérgicas relacionadas; los autores hallaron 5 posibles epitopos (1, 2, 3, 4, 5) en el alérgeno en estudio, Ani s 13.

4.14 Ani s 14

Alérgeno descrito por Kobayashi *et al.* (2015), mediante la estrategia anteriormente descrita, inmunocribado de genoteca de expresión de las larvas 3 de *A. simplex* s.l. con quimioluminiscencia. Ani s 14 es un alérgeno mayor, reconocido por el 54% de pacientes alérgicos a *Anisakis*.

El ADNc de Ani s 14 tenía 1259 nucleótidos, y expresaba un polipéptido de 217 residuos, sin péptido señal y con un peso molecular teórico de 23.5 kDa. El alérgeno presentó dos regiones homólogas entre sí (36%), compuestas por una estructura común (CX₈CX₆CX_{22,26}C); este tipo de secuencias repetidas con cuatro cisteínas ya fueron descritas en Ani s 7 y Ani s 12 (Rodríguez *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2011), si bien no se encontró similitudes entre las tres moléculas. Ani s 14 también mostró otras secuencias redundantes, con 3 a 5 aminoácidos, posiblemente epitopos reconocidos por IgEs específicas. Los estudios de comparación con otras moléculas depositadas en

los bancos de datos no encontraron dominios, homologías relevantes, por lo que se concluyó que no pertenecía a ninguna familia de proteínas descrita, si bien se observó similitudes entre regiones de Ani s 14 y proteína hipotética de *Toxocara canis*, y regiones de Ani s 7 y Ani s 12 (Rodríguez *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2011).

Finalmente, es importante seguir en el estudio de los diferentes alérgenos detectados en las diferentes formas clínicas de los procesos alérgicos asociados a *Anisakis* spp. para así desarrollar nuevas herramientas que nos permitan el diagnóstico certero. Determinar los alérgenos en cada forma clínica permitiría identificar tanto los alérgenos cross-reactivos como los alérgenos únicos relacionados con cada forma.

5. Otros posibles nuevos alérgenos de *A. simplex* s.l.

5.1 Identificados mediante técnicas de proteómica

Son escasos los estudios que se han realizado sobre la identificación de alérgenos de *A. simplex* s.l. mediante técnicas de proteómica. Entre ellos cabe destacar el llevado a cabo por Nieuwenhuizen *et al.* (2013), que utilizó el análisis de huella peptídica o *PMF* (*Peptide mass fingerprinting*) y la espectrometría de masas tándem (MS/MS) para la identificación de la hemoglobina de *A. pegreffii*, después también identificado como Ani s 13 en *A. simplex* s.l. Además, los autores evaluaron su alergenidad, expresión estado-específica y propiedades protectoras en comparación con hemoglobinas de otros nematodos.

Así mismo, Fæste *et al.* (2014) aplicaron estas técnicas para la identificación de posibles nuevos alérgenos de *A. simplex* s.l.; los autores utilizaron el análisis proteómico por espectrometría de masas, específicamente nano-cromatografía de líquidos en fase inversa, ionización por electrospray con espectrometría de masas en tándem (*nano-LC-ESI-MS/MS*) y el mismo análisis, pero con empleo de espectrómetro de masa *orbitrap* (*nano-LC-ESI-orbitrap-MS/MS*). El experimento fue realizado con extracto crudo de larvas de *A. simplex* s.l. y 2 grupos poblacionales. El primer grupo formado por 14 pacientes españoles diagnosticados con anisakiosis gastroalérgica o alergia asociada a *Anisakis* s.l. y el segundo conformado por 13 pacientes noruegos co-sensibilizados frente a *A. simplex* s.l. y ácaros y/o camarones, con el fin de estudiar posibles reacciones cruzadas con otros alérgenos. Identificaron 39 bandas de proteínas, en un rango de 5 a 200 kDa, reconocidas por anticuerpos IgE de los pacientes, a través de técnica de inmunotransferencia; observaron mayor reactividad en el rango de 5 a 80 kDa con la banda de 55,5 kDa como la más reactiva. La caracterización de proteínas de *A. simplex* s.l. mediante espectrometría de masa reveló 103 proteínas, de las cuales 94 no habían sido descritas previamente. La mayoría de las proteínas estaban implicadas en función estructural y músculo locomotor, procesos de transcripción o traducción, sistema de reparación de ADN nuclear, proteínas asociadas a síntesis de otras proteínas, proteínas reguladoras, siendo las enzimas el grupo más grande de todas las caracterizadas. De la misma manera, clasificaron posibles proteínas

alergénicas en 33 familias, detectando alergenitos conocidos tales como Ani s 2, Ani s 3, Ani s 8, entre otros, así como otros alergenitos no descritos anteriormente.

El análisis de los patrones de reactividad observado en cada grupo de pacientes demostró ligeras diferencias en 5 bandas proteicas. En el grupo de pacientes noruego co-sensibilizados, la reactividad más intensa se observó en una proteína de 68 kDa (posible proteína de choque térmico 70 (HSP70) de *A. simplex* s.l. presente también en ácaros) mientras que en el grupo español se observaron en proteínas de pesos moleculares de 13,7 (Ani s 8), 25,3 (triosa fosfato isomerasa), 47,5 (enolasa) y 63,7 kDa (endoquitinasa). Al evaluar posibles alergenitos causantes de reacciones cruzadas, encontraron 17 candidatos mediante comparación con proteínas homólogas de nematodos, insectos o mariscos. La miosina, miofilina, α -amilasa, HSP70 y arginina kinasa, son algunas de las posibles proteínas causantes de reacción cruzada encontradas en el estudio.

Otro estudio realizado mediante técnicas de proteómica fue el desarrollado por Arcos *et al.* (2014) donde evaluaron el perfil proteico y caracterizaron las proteínas diferencialmente expresadas por *A. simplex* s.s., *A. pegreffii* y la especie híbrida. Para ello, las proteínas de extractos crudos de larvas de *A. simplex* s.s., *A. pegreffii* e híbrido (previamente identificadas por técnicas de biología molecular) se sometieron a electroforesis en dos dimensiones (2D) y *western blotting* (con sueros de pacientes con sensibilización a *A. simplex* s.l. (comprobada por pruebas serológicas, SPT e historia clínica). La identificación de las proteínas de interés se llevó a cabo mediante el sistema de espectrometría de masas con MALDI-TOF-TOF (Maldi/analizador tiempo de vuelo-Analizador de tiempo de vuelo) o secuenciación “de novo”. Obtuvieron 69 *spots* de los cuales 24 eran comunes para las especies *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, 34 específicas para *A. simplex* s.s. y 11 específicas para *A. pegreffii*; con respecto a la especie híbrida, 6 *spots* fueron específicos de esta especie y se determinó que compartía 11 *spots* con las otras 2 especies en estudio y otros 3 exclusivamente con *A. simplex* s.s. Las proteínas con mayor reactividad se encontraron en el rango de 7,1 a 80 kDa. Así mismo, identificaron 98 proteínas correspondientes a 24 familias de proteínas diferentes. Aunque no localizaron los alergenitos mayores de *A. simplex* s.l. en el extracto crudo, sí que identificaron proteínas comunes entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, como anquirina unc-44, enolasa, familia de lectinas con afinidad por residuos de galactosa, subunidad α de proteosoma tipo I, entre otras.

5.2 Identificados por otras aproximaciones tecnológicas: RAST, cribado de genotecas, etc.

Arlian *et al.*, en 2003, caracterizaron alergenitos de *A. simplex* s.l. presentes en extracto crudo de larvas L3 del nematodo, mediante inmunoelectroforesis cruzada (CIE) y radioinmunoelectroforesis cruzada (CRIE). CIE se llevó a cabo con anti-suero de conejo, producido por inmunización con antígenos somáticos del nematodo; después, con los geles CIE ya tratados, se desarrolló CRIE con la incubación posterior con mezcla de sueros de pacientes con reacciones alérgicas anti- *A. simplex* (positivos por InmunoCAP). A continuación, los geles se trataron con un

anticuerpo anti-humano IgE marcado radioactivamente (I^{125}). Los resultados obtenidos demostraron 18 proteínas de unión a IgE, moléculas diferentes de *A. simplex* s.l., de las que 5 fueron reconocidas por $\geq 50\%$ de los pacientes.

López y Pardo, en 2011, construyeron dos genotecas en fagos *pluFo* con ADNc del nematodo (B1 y B2). Una vez amplificadas, la genoteca B1 se enriqueció por inmuno-afinidad mediante tratamientos sucesivos con un anticuerpo policlonal frente a extracto crudo de *A. simplex* s.l., y la B2 por tratamientos con mezcla de sueros de pacientes con anisakiosis. De esta manera, los autores obtuvieron algunos posibles candidatos alérgicos. Identificaron una proteína (Ani s FBPP) en el 34% de los fagos, que era miembro de la familia de fructosa 1,6-bifosfatasa, y a la que propusieron como posible candidato alérgico. También encontraron otras moléculas, como Ani s 24 kDa, Ani s citocromo C oxidasa, Ani s citocromo B, Ani s NADHDS4L, Ani s NARaS, Ani s PEPB y Ani s Troponina.

6. Genoma y transcriptoma de *A. simplex* s.l.

En el año 2014, el Instituto Sanger en colaboración con la Dra. Carmen Cuellar (Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid) realizaron el ensamblaje y mapeo de secuencias computacionalmente usando el sistema Illumina en combinación con extremos pareados ("paired-ends"). La predicción de genes la llevó a cabo el Instituto Sanger en conjunto con *WormBase*, como parte de la iniciativa de caracterizar 50 genomas de helmintos (Helminth Genomes Consortium). El tamaño del genoma obtenido fue de alrededor de 127 Mb, de los cuales 21 Kb son genes codificantes (http://parasite.wormbase.org/Anisakis_simplex_prjeb496/Info/Index/).

Hasta hace poco, no se habían obtenido datos del transcriptoma de *A. simplex* s.l. Recientemente, Baird *et al.*, 2016, caracterizaron el transcriptoma de dos de las especies del complejo *A. simplex* (*A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*). Consiguieron un alrededor de 65.000.000 lecturas desarrolladas a partir de una librería de ADNc para cada especie. Las lecturas fueron ensambladas aproximadamente en 34.000 transcritos mientras que alrededor de 18.000 péptidos obtenidos se clasificaron según su homología, motivos proteicos y ontología génica y su implicación en rutas biológicas. Se identificaron además 36 y 29 alérgenos putativos de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, respectivamente. Se caracterizaron, además, alérgenos no descritos tales como HSP70, ciclofilina y ABA-1. El estudio reveló además la existencia de una mayor similitud entre las secuencias de *Anisakis* y *A. suum*, que con *T. canis*.

En el presente trabajo hemos realizado la síntesis y ensamblaje del transcriptoma de *A. simplex* s.l. antes de la publicación del transcriptoma de las especies gemelas *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* (Baird *et al.*, 2016).

OBJETIVOS

Objetivo general

Buscar, identificar y caracterizar a nivel molecular nuevos alergenos (teóricos y demostrados experimentalmente) de la larva 3 de *A. simplex* s.l. a través de la aplicación de técnicas “ómicas”.

Objetivos específicos

1. Sintetizar, secuenciar, ensamblar y anotar, estructural y funcionalmente, el transcriptoma de la larva 3 de *A. simplex* s.l.

2. Identificar y caracterizar alergenos putativos del parásito por análisis “in silico”, mediante el estudio de los datos generados a partir del transcriptoma obtenido en el objetivo 1 y los disponibles en bases de datos públicas de alergenos.

3. Identificar y caracterizar nuevos alergenos por medio del empleo de sueros de pacientes con diferentes patologías alérgicas relacionadas con *A. simplex* s.l. en combinación con técnicas de inmunocribado junto con abordajes de proteómica, basados en espectrometría de masas, y análisis bioinformáticos.

4. Caracterizar a nivel molecular los genes de los alergenos principales Ani s 7 y Ani s 14.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Obtención de larvas y antígenos de *A. simplex* s.l.

1.1 Larvas 3

Las larvas 3 se extrajeron manualmente de la superficie del hepatopáncreas y del tejido muscular de bacaladillas (*M. poutassou*). Una vez extraídas, se lavaron con tampón fosfato salino (PBS, 137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,2) y posteriormente fueron congeladas a -80°C hasta su uso. En el caso de las larvas que se iban a utilizar para la obtención de antígeno excretor secretor, el material se lavó tres veces con PBS y gentamicina al 0,4% y se procedió como se indica en el apartado “1.3. Antígenos de excreción secreción (ES)”. El resto de las larvas fueron conservadas en *RNA Later* (Sigma-Aldrich), o bien fueron congeladas a -80°C.

1.2 Antígenos somáticos

El extracto crudo de *A. simplex* s.l. se obtuvo homogeneizando 1 g de larvas 3, mediante la ayuda de un mortero. Una vez pulverizadas, se resuspendieron en PBS y se incubaron a 4°C durante 4 h. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 14.000 rpm durante 90 min a 4°C. El sobrenadante, que contenía los antígenos solubles, se separó del sedimento y se almacenó a -80°C hasta su utilización. La determinación de la concentración de proteínas se llevó a cabo mediante el método de Biuret utilizando el kit comercial Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific) (ver apartado 7. Valoración de la concentración proteica).

1.3 Antígenos de excreción secreción (ES)

Para la obtención de los productos de ES se siguió el protocolo establecido por Moneo *et al.*, en el año 2002. Para ello, se cultivaron 250 larvas 3 vivas de *A. simplex* s.l. a 37°C con un 5% de aporte de CO₂ en medio *RPMI 1640* (*Roswell Park Memorial Institute*; Sigma-Aldrich) acidificado con 50 mM de ácido clorhídrico (pH 2,8). El medio se recogió cada 24 h, añadiendo medio fresco, hasta completar las 96 h. Las muestras de medio obtenidas se filtraron a través de filtros *SLHV025 NS* (0,45 µm poro, 25 mm diámetro, membrana de PVDF, no estériles; Corning) y se concentraron con un disco de ultrafiltración (10 KDa, 43 nm de poro; PALL) y una célula de agitación (*Amicon® stirred cells*; Millipore) a una presión de 5 bares (75 psi). Tras la concentración se determinó la concentración proteica de las muestras (*Pierce™ BCA Protein Assay*, Thermo Scientific) y posteriormente se almacenaron a -80°C hasta su uso.

2. Sueros

Se utilizaron en general sueros humanos procedentes de una colección registrada (C.0003989) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII; Majadahonda, España) que cumplieran con los requisitos del Comité de Ética de la Investigación (CEI) del ISCIII.

2.1 Sueros de patologías alérgicas relacionadas con *A. simplex* s.l.

Para el análisis proteómico de los antígenos de ES del nematodo, mediante electroforesis bidimensional, se utilizaron conjuntos de sueros de cuatro grupos de sujetos. Los criterios clínicos para la clasificación de los pacientes fueron:

1. *Anisakiosis gastroalérgica* (AGA): 4 pacientes con historia de urticaria aguda/ angioedema o anafilaxia de menos de 48 h de duración, dentro de las 48 h tras la ingesta de pescado crudo o poco cocinado, acompañada de SPT positivo e IgE específica contra *A. simplex* s.l.

2. *Urticaria crónica asociada a sensibilización a Anisakis* spp. (UC+): 4 pacientes con habones recurrentes, al menos dos veces por semana, de al menos seis semanas de duración concomitante con una sensibilización a *Anisakis* spp. (SPT positivo e IgE específica contra *A. simplex* s.l.). Para reducir la probabilidad que la sensibilización fuera producida por reactividad cruzada y aumentar la probabilidad de evento parasitario agudo previo, la IgE específica frente a *Anisakis* spp. debía ser de mínimo 15 kU/l.

3. *Anisakiosis digestiva* (D): 3 pacientes con manifestaciones gástricas sin síntomas cutáneos asociados, tras la ingesta de pescado crudo o poco cocinado en las 48 tras su ingesta y estudio posterior positivo en SPT y IgE específica frente a *Anisakis* spp., así como bajada significativa de la IgE específica en revisión tras 6 meses. Este criterio diagnóstico ha sido validado previamente sin necesidad de confirmación gastroscópica de la larva de *Anisakis* spp.

4. *Sensibilización subclínica* (SBC): 4 pacientes estudiados en la consulta de alergia por otros motivos (reacción adversa a fármacos, alergia respiratoria no causada por sensibilización a artrópodos. IgE específica detectable frente a *Anisakis* spp. de al menos 5 kU/l. Exclusión de reactividad cruzada por IgE frente a artrópodos u otros parásitos mediante SPT y/o IgE específica.

Los sueros de los pacientes de los grupos fueron seleccionados prospectivamente según criterios clínicos y analíticos por el Dr. Daschner en la consulta

de alergia del Hospital Universitario de la Princesa y recogidos en una colección (Registro Biobancos ISCIII: C.0002551) siguiendo los criterios bioéticos vigentes.

3. Síntesis de librerías de ADNc de *A. simplex* s.l.

3.1 Síntesis de librerías estándar de ADNc

La extracción de ARN mensajero (ARNm) se realizó a partir de 1 g de larvas 3 de *A. simplex* s.l., procedentes de bacaladillas (*M. poutassou*), con el kit *FastTrack*® 2.0 (Invitrogen) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. El ARNm se resuspendió en 25 µl de agua libre de ARNasas y se almacenó a -80 °C. Posteriormente, el ARNm así obtenido se usó como molde para las síntesis de una librería estándar de ADNc. La síntesis de ADNc se llevó a cabo mediante el kit *Marathon*™ *cDNA Amplification* (Clontech Laboratories) según las instrucciones del fabricante. Una vez sintetizados se procedió a ligar adaptadores (AP1) de secuencia conocida en sus extremos. Esta colección se utilizó para todos los ensayos de clonación de los genes que se presentan en esta memoria.

3.2 Síntesis de librerías normalizadas de ADNc (ADNc-N)

La extracción de ARN total se realizó a partir de 1 g de larvas 3 de *A. simplex* s.l., procedentes de bacaladillas (*M. poutassou*) mediante el kit *TruSeq*® *Stranded Total RNA Sample Preparation* (Illumina®); este kit permite eliminar el ARN ribosomal y los transcritos abundantes, así como también ADN contaminante. El ARN-poliA (ARNm) fue aislado y, posteriormente, fraccionado en segmentos pequeños. El ARNm obtenido se utilizó para las síntesis de la librería normalizada de ADNc (*DSN library normalization*, Illumina). Una vez realizada la síntesis de los ADN complementarios y ligación de adaptadores correspondientes, se seleccionó el tamaño de los fragmentos de ADNc en un gel de electroforesis para posteriormente amplificarlos por PCR. Esta colección se utilizó para los ensayos de secuenciación masiva del transcriptoma que se detallan a continuación.

La obtención de ARN total, síntesis de librería ADNc-N, secuenciación masiva, primer ensamblaje y anotación del transcriptoma se llevó a cabo en colaboración con la empresa *Biomol Informatics* (Parque Científico de Madrid, Universidad Autónoma).

4. Secuenciación masiva

Los genes de la librería ADNc-N se secuenciaron mediante técnicas de *Next Generation Sequencing* (NGS). Se utilizó una plataforma *Illumina GAIIx*, donde la amplificación de ADN se lleva a cabo a través de una "PCR de puente", en la que los

fragmentos se amplifican a partir de los cebadores complementarios unidos a una superficie sólida, formando puentes de doble cadena. Después de múltiples procesos de desnaturalización y extensión se obtienen millones de copias a partir de cada ADN molde y se realiza la secuenciación.

Tras la secuenciación, los datos obtenidos se filtraron para eliminar lecturas de baja calidad así como también artefactos, como son las secuencias correspondientes a adaptadores, ADN contaminante y secuencias duplicadas derivadas de la PCR. Para ello, se utilizaron las herramientas *CASAVA v18*, *cutadapt v1.0*, *FastQC 0.10.0* y *Prinseq 0.17.1*.

5. Ensamblaje “de novo” (E1) y anotación del transcriptoma de *A. simplex* s.l.

La lectura de nucleótidos (“*base calling*”) y la asignación de la calidad de las lecturas se realizó mediante el *software* estándar de *Illumina* “*Illumina's Data Analysis Pipeline*”. El ensamblaje del transcriptoma “de novo” se llevó a cabo utilizando la herramienta *Oases 0.2.1* (Schultz *et al.*, 2012) y para el refinamiento del ensamblado, reconstrucción de contigs y filtrado de singletons, el programa *CAP3* (Huang y Madan, 1999). El programa *Oases* está disponible en <http://www.ebi.ac.uk/~zerbino/oases/>. Posteriormente, se utilizó la herramienta *Bowtie* para el mapeo de lecturas. La predicción de regiones con secuencias de ADN codificante (CDS) se realizó con la herramienta de predicción de genes *GeneID*, seleccionando aquellos que presentaron ≥ 30 aa. La detección de proteínas por homología se hizo mediante *BLASTx* (Evalue 10^{-5}) frente a las bases de datos de NCBI. Se llevó a cabo la anotación funcional de las proteínas putativas a partir de los transcritos ensamblados con las herramientas *Blast2GO* (Conesa *et al.*, 2005) y *KEGG* (Kanehisa *et al.*, 2012). El código de enzima y la anotación en la ruta KEGG se generó de forma directa mediante el mapeo del término GO a su código de enzima equivalente. Por otro lado, se empleó el programa *InterProScan* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) para la identificación de dominios proteicos.

En la tabla 2 se resumen los diferentes programas informáticos empleados para el ensamblaje y anotación de los genes del transcriptoma de *A. simplex* s.l.

Tabla 2. Programas informáticos empleados para el ensamblaje y anotación de los genes del transcriptoma de *A. simplex* s.s.

Ensamblaje y refinamiento	Mapeo de lecturas	Predicción de CDS	Anotación estructural	Anotación funcional	
				<i>Transferencia por homología</i>	<i>Identificación de dominios</i>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Oases</i> • <i>CAP3</i> 	<i>Bowtie</i>	<i>GeneID</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Método “<i>ab initio</i>” • Método basado en homología (<i>GeneID</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>BLASTx</i> • <i>Blast2GO</i> • <i>KAAS</i> 	<i>InterProScan</i>

Una vez que se anotaron los resultados de *BLAST* e *InterProScan*, se empleó el programa *Annex* (Myhre *et al.*, 2006) por el que se logra entre 10% y 15% de anotaciones adicionales y se confirma alrededor del 30% de los términos GO. *Annex* se desarrolló para aumentar y completar las anotaciones funcionales previas.

6. Ensamblaje “de novo” guiado por referencia (E2) y anotación del transcriptoma *made in house* (MH) de *A. simplex* s.l.

Debido a la publicación del genoma del parásito *A. simplex* (50 *Helminth Genome Initiative* - Sanger: <http://www.sanger.ac.uk/science/collaboration/50hgp>), después de haberse obtenido el primer ensamblaje, se realizó un segundo ensamblaje “de novo” basado en referencia. La referencia corresponde a la base de datos de transcritos del genoma ensamblado de *A. simplex*, GCA_000951095.1, de Sanger (Kevin *et al.*, 2016). Para ello, se utilizaron los datos de la secuenciación del ARN (ARN-seq) obtenidos del ensamblaje del transcriptoma “de novo” anterior (E1). Los datos se filtraron con las herramientas *cutadapt*, *FastQC* y *NGS QC Toolkit*. El ensamblado E2 se hizo mediante *TopHat* (<http://tophat.cbcb.umd.edu/>) y *Cufflink* (<http://cufflinks.cbcb.umd.edu/>). Una vez finalizado el ensamblaje, se realizó la comparación de los datos obtenidos frente al transcriptoma ensamblado anteriormente (E1) y las secuencias proteicas obtenidas se analizaron frente al proteoma de organismos invertebrados de *SwissProt-Uniprot*. Este ensamblado se llevó a cabo en la Unidad de Bioinformática del Centro Nacional de Microbiología (CNM-ISCIII).

Tras la obtención de los dos ensamblajes, el análisis de las secuencias se llevó a cabo con las bases de datos y herramientas bioinformáticas que se detallan en la tabla 7.

7. Predicción de proteínas de ES y proteínas potencialmente alergénicas en el transcriptoma MH

7.1 Predicción de proteínas de ES

Se creó una base de datos con las proteínas de ES predichas según Garg y Ranganathan (2011), incluyendo proteínas con péptido señal, proteínas secretadas por la vía no clásica y excluyéndose las proteínas transmembrana y mitocondriales. Los programas utilizados se indican en la tabla 6 del apartado "20. Programas para el análisis bioinformático", de esta sección.

7.2 Predicción de proteínas potencialmente alergénicas

La predicción se realizó mediante comparación de los transcriptos ensamblados con la base de datos de ES y de las secuencias de los alergenitos presentes en las tres bases de datos de moléculas alergénicas: *Allergome* (Scala M, 2006; <http://www.allergome.org>), *Allermatch* (Fiers *et al.*, 2004; <http://allermatch.org>), *FARRP* (Food Allergy Research and Resource Program allergen database administered by the University of Nebraska, Lincoln; Goodman, 2008; <http://www.allergenonline.com>), seleccionándose aquellas incluidas en las tres bases de datos y que eran proteínas de ES.

Una vez identificados los alergenitos putativos, estos se compararon con proteínas de ES de otros nematodos y con proteínas similares en humanos. Se eligieron como mejores candidatos aquellos que presentaban una similitud mayor a 60% con nematodos y menor de 30% con alergenitos humanos.

Para facilitar la comprensión, en la figura 1 se ilustra el proceso realizado para la generación y análisis de datos del transcriptoma MH de *A. simplex*, mientras que, en la figura 2 se detalla el proceso llevado a cabo para el análisis de los datos del transcriptoma MH.

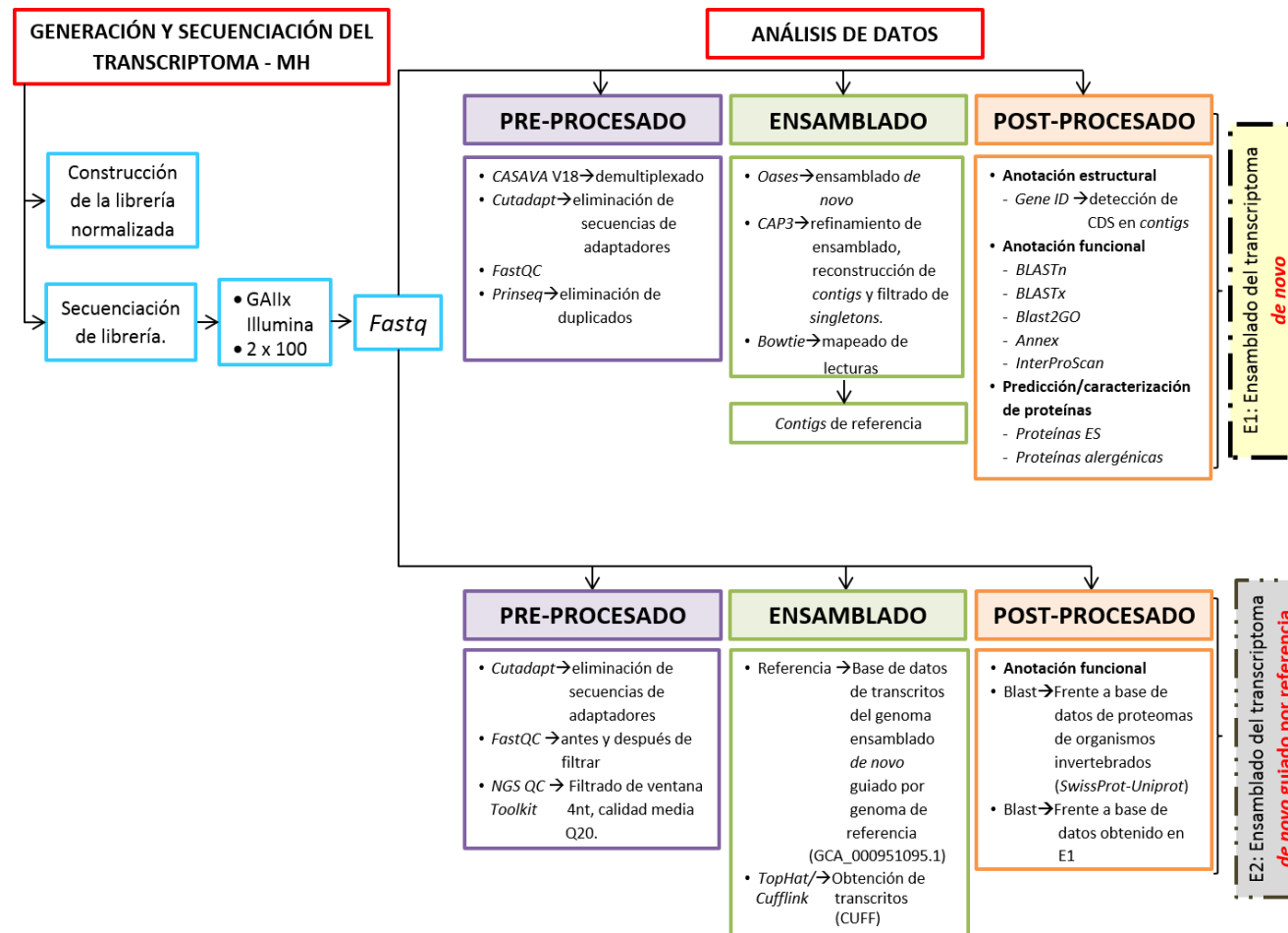


Figura 1. Diagrama de flujo de la generación y análisis de datos del transcriptoma MH de *A. simplex* s.l.

Fase 1: generación y secuenciación de una librería de ADNc-N. Fase 2: análisis de datos. A partir de las lecturas *fastq*, obtenidas en la fase 1, se realizaron dos ensamblados del transcriptoma: “de novo” (E1) y “de novo” guiado por referencia (E2). El análisis de datos para cada ensamblado se realizó en 3 etapas: una primera etapa de pre-procesado (rectángulos morados) para el filtrado de las lecturas *fastq*, una segunda (rectángulos verdes) donde se lleva a cabo el ensamblado obteniéndose *contigs* (E1) y transcritos (E2), anotados estructural y funcionalmente en la tercera etapa de post-procesado (rectángulos naranjas).

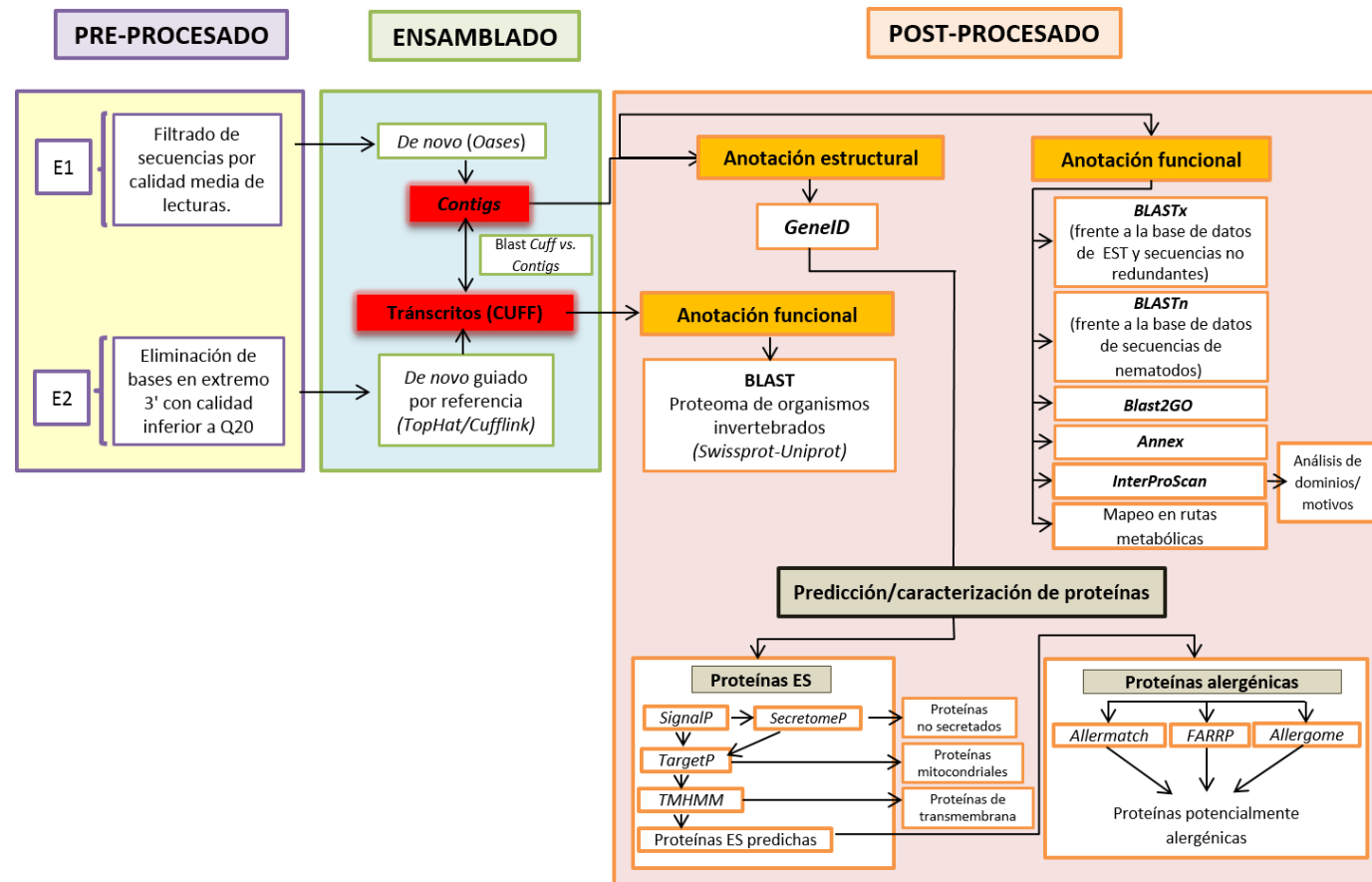


Figura 2. Diagrama de flujo del análisis de los datos del transcriptoma MH de *A. simplex* s.l.

Etapas que componen el análisis de datos del transcriptoma MH de *A. simplex*: pre-procesado (morado), ensamblado (verde) y post-procesado (naranja). A partir de los *contigs*, obtenidos del primer ensamblado (E1), se realizó la anotación estructural mediante *GeneID* y la anotación funcional a través de los programas expuestos en el diagrama. A partir de la anotación estructural se predijeron proteínas de ES y alergénicas. Los transcritos derivados del ensamblado 2 (E2) se anotaron funcionalmente mediante *BLAST*, frente a base de datos de proteínas de organismos invertebrados. Los *contigs* y sus transcritos correspondientes se interrelacionaron mediante *BLAST*.

8. Clonación de los genes que expresan los antígenos de interés en vectores de mantenimiento

La clonación de los genes que expresan los antígenos recombinantes estudiados en el presente trabajo se llevó a cabo a partir de las amplificaciones de los ADNc sintetizados en el apartado 3.1. Las reacciones de amplificación se realizaron mediante PCR convencional y por PCR *touchdown*, en función del gen a amplificar, y siguiendo el protocolo del kit *Marathon™ cDNA Amplification* (Clontech Laboratories) en la última opción. La PCR convencional estuvo compuesta de una etapa inicial de desnaturalización a 94°C por 1 min, posteriormente se realizaron 30 ciclos conformados por una desnaturalización a 94°C por 30 s, una fase de hibridación a una temperatura (T^a) igual a la de anillamiento de cada cebador (tabla 2) por 30 s, acabando con una fase de extensión a 72°C por 2 min. Después, se llevó a cabo una extensión final a 72°C por 7 min. En la tabla 3, se resumen los genes amplificados mediante PCR convencional y las características de los cebadores utilizados para la amplificación.

**Tabla 3. Genes amplificados mediante PCR convencional en el presente trabajo.
Secuencia y características de cebadores (directo y reverso)**

VA1: alérgeno venom VA1; VA2: alérgeno venom VA2; Ani s 7: fragmentos amplificados del alérgeno principal Ani s 7; alérgeno ATP-6: aspartil proteasa; alérgeno ATP-4: alérgeno 24kDa.

Gen	Secuencia de los cebadores	T ^a de anillamiento
ATP-1: VA1	D: 5'- TGGTATCAACGCAACGGCCGC – 3' R: 5'- TTACGGCGACAAACAAAGATTGGTAGACGTAT – 3'	63,0°C
VA2	D: 5'- GAACGGAGTGTATTATCGAGCCAAAAATTTGTATA – 3' R: 5'- AATTGCGAAATGTGGACACG – 3'	62,5°C
Ani s 7	D1: 5'- ATGCTCAGAGCACTTTTCTGGTTGTCATCTTTTC – 3' D2: 5'- ATGAACAATCAAAATACCGGAGTAATCAATCCAG – 3'	65°C
	D3: 5'-TCTCCCAAGCACCTTGGCTCATACCAAGTG – 3' D4: 5'- ATGATGCACAAATGCTTAAAGTCGGAAATGGAAAATCC – 3' D5: 5'- GATGATTCTGCTTGAGTCTCGGAAAAGCTTGCT – 3'	70°C
	R1: 5'- TTGCGACATGACGTCTACAGTATTCGATGGAC – 3'	65°C
	R2: 5'- TTTCGACATTATACCTCCACGGTCTTCTTAGATT – 3'	67°C
	R3: 5'- AGCATTGTGCATCATTGGTGGTAGATTTGTTTCAGAT – 3' R4: 5'- AAGACTTATCATGGAGGATGGTACATTGTTGAGTTCAGCAC – 3' R5: 5'- TTAGTTGCTAGCTCTGTTACAGGACGATATAAGCAATTGATTAGTT – 3'	70°C
ATP-6: aspartil proteasa	D: 5'- ATAATAAGGGTACCGATAATGAAACGAAATG – 3' R: 5'- TTAAGTTCGAGCAGCTTGCGCC – 3'	57,5°C
ATP-4: Alérgeno 24kDa	D: 5'- ATGCAACGTATGTGTACGTGTGATGAA – 3' R: 5'- TTATTGTATGATGAGACGAGGGCATAATC – 3'	57,5°C

En cuanto a la PCR *touchdown*, se empleó en los casos en los que se desconocía la secuencia exacta de los extremos de la secuencia a amplificar. Para ello, se empezó con una desnaturalización a 94°C por 30 s y una temperatura de hibridación alta (72°C) por 2,5 min,

durante 5 ciclos. Posteriormente, la temperatura de hibridación se disminuyó 2°C hasta alcanzar una temperatura de 68°C por 2,5 min. Una vez alcanzada ésta temperatura se realizaron 25 ciclos hasta obtener el producto amplificado. Los genes amplificados mediante este tipo de PCR, se describen en la tabla 4, junto a los cebadores utilizados para la amplificación. Los cebadores utilizados en este trabajo fueron sintetizados por Sigma-Aldrich.

**Tabla 4. Genes amplificados mediante PCR *touchdown* en el presente trabajo.
Secuencia y características de cebadores (directo y reverso)**

Alergeno ATP-7: peptidasa; alergen ATP-12: similar a Ani s 7; ATP-13: neprilisinas; cebador universal: AP1.

Gen	Secuencia de los cebadores	Tª de hibridación
ATP-7: Peptidasa	D: 5'- GGTGCGGGGCGATGACCTCGTACAAATG – 3' R: 5'- GTGCGCGATGACGCCGAATATGGCTC – 3'	71,9°C 71,9°C
ATP-12: Ani s 7-like	D: 5'- GGGGCACTATCGAAGACCAACGATGAGGTGA – 3' R: 5'- TCATGGACTCTCTGCTCGAGATTTTGC AAACCA – 3'	70,8 °C 71°C
ATP-13: Neprilisina	D: 5'- ATGGATGAGCAACCAAAAAATTGCCA – 3' R: 5'- GCACTTGGTGACCGGATTCATTGC – 3'	64,7°C 63,2°C
Cebador Universal	AP1: 5' - CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC – 3'	71°C

Una vez obtenido el producto amplificado, se realizó una mezcla de ligación de los genes seleccionados con el vector *pGEM®-T Easy* (Promega), utilizado para todas las clonaciones. Las reacciones de ligación siguieron los protocolos estándar ya descritos (Sambrook y Russell, 2001). Se transformaron células *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44* *relA1*, *lac[F'proAB lacIqΔM15 Tn10]*) con la mezcla de ligación a 42°C durante 45 s y posteriormente se enfriaron en hielo por 2 min. Las células transformadas se crecieron en medio líquido durante 1 h y se sembraron en placas de Petri con medio LB (Luria-Bertani; 10 g/l NaCl, 10 g/l triptona, 5 g/l Extracto de levadura) suplementado con 1,5% (p/v) de bactoagar y 100 µg/ml de ampicilina. Al día siguiente, se llevó a cabo el protocolo de PCR de colonias para determinar la presencia del recombinante en el vector (Sambrook y Russell, 2001). Finalmente, los ADNs plasmídicos obtenidos se purificaron y secuenciaron según se describe en el apartado de secuenciación (ver apartado “10. Secuenciación de ácidos nucleicos”).

9. Valoración de la concentración de ADN

Para la determinación de la concentración de ADN se empleó un espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV/VIS) de cuantificación de ADN (*NanoDrop 1000 Spectrophotometer*; Thermo Scientific). Se midió la densidad óptica a 260 nm (DO_{260nm}) y a 280 nm y se calculó la concentración real teniendo en cuenta que $DO_{260nm} = 1$ equivale a una concentración de 50 µg/ml de ADN.

10. Secuenciación de ácidos nucleicos

La extracción de ADN plasmídico se llevó a cabo mediante el kit *QIAprep® Spin Miniprep* (Qiagen). La secuenciación automática se realizó, por el método de Sanger *et al.* (1977), en la Unidad de Genómica del CNM-ISCIII, empleando el kit *Big-Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (PE Biosystems) y un secuenciador de ADN *3730 XL DNA Analyzer* (Applied Biosystems).

11. Subclonación de genes que expresan antígenos de interés en vectores de expresión

La subclonación de los genes se llevó a cabo en el vector de expresión procariota pQE30, para generar proteínas de fusión con colas de histidinas. En la tabla 5, se describen los cebadores y vectores utilizados en este proceso. En la subclonación se emplearon protocolos de PCRs convencionales y cebadores, que permitían la modificación de los genes según el diseño experimental y el vector (Sambrook y Russell, 2001; tabla 5). Las reacciones de ligación y transformación de células competentes, se realizaron como se describió en el apartado anterior, al igual que la confirmación de clones positivos, mediante PCR de colonias, y obtención, purificación y análisis de los mismos (ver apartado “8. Clonación de los genes que expresan los antígenos de interés en vectores de mantenimiento”, de esta sección).

Tabla 5. Nombre de la molécula (genes que expresan los antígenos de interés), secuencia y características de cebadores utilizados en la subclonación, temperatura de hibridación y vector de clonación

Se encuentran subrayados los sitios de corte de enzimas de restricción, según el vector utilizado.

Molécula	Secuencia de los cebadores	Tª de hibridación	Vector de clonación
ATP-1: VA1	F: 5'- GAGAGAGAGGATCCCAATGGGACTGCCC – 3' R: 5'- TCTCTCTCAAGCTTTACGGCGACAAACAAAGATT- 3'	65ºC	pQE30
VA2	F: 5'- GAGAGAGAGGATCCGAACGGAGTGTTCATCGA – 3' R: 5'- TCTCTCTCGCGCCGCTCGTGTC – 3'	65ºC	

12. Expresión proteica de los genes de interés para la obtención de los antígenos recombinantes

A partir de una colonia de células *E. coli* M15pREP4 (F-, Φ 80 Δ lacM15, thi, lac-, mtl-, recA+, KmR; Hanahan, 1983) transformadas con la secuencia de interés en el vector de expresión pQE30, se prepararon cultivos en medio LB con el antibiótico específico para el gen de resistencia

que portase el plásmido empleado. Los cultivos se crecieron a 37°C, en agitación a 200 rpm (*Ecotron*; Infors HT) hasta alcanzar una $DO_{600\text{ nm}}$ 0,6-1,0. Su crecimiento se valoró por turbidimetría utilizando el espectrofotómetro *Ultrospec 3000* (Pharmacia Biotech). Se tomaron alícuotas de los cultivos no inducidos, se añadió IPTG a diferentes concentraciones (0,1 mM – 1 mM), y se incubaron a diferentes tiempos (4 h o 20 h) y temperaturas (16°C o 37°C), para así establecer las condiciones óptimas de expresión mediante el análisis de alícuotas correspondientes a los distintos tratamientos. Una vez elegidas las condiciones óptimas, la inducción se llevó a cabo en cultivo a gran escala, se tomaron alícuotas de los cultivos inducidos y sin inducir, y el resto de la muestra se centrifugó. Los sedimentos obtenidos se almacenaron a -80°C hasta su uso. La verificación de la expresión proteica se realizó visualizando las alícuotas controles en un gel de poliacrilamida de una concentración adecuada para el peso molecular de la proteína recombinante a purificar.

Las proteínas insolubles se purificaron mediante cromatografía de afinidad con níquel y urea en condiciones desnaturalizantes (ver apartado 13.1 Cromatografía de afinidad con níquel y urea).

13. Purificación de los antígenos recombinantes mediante cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes

El modo de la expresión génica afecta a la solubilidad de la proteína producida. Las proteínas suelen estar localizadas en el citoplasma de *E. coli* o secretadas al exterior a través de la membrana celular. En ocasiones, los altos niveles de expresión de una proteína en *E. coli*, resultan en la formación de gránulos citoplasmáticos, o cuerpos de inclusión, compuestos por agregados insolubles de la proteína expresada. En estos casos, se deben emplear técnicas mecánicas, sonicación y/o lisozima, y detergentes desnaturalizantes para la solubilización, y posterior renaturalización de las proteínas (Marston, 1986).

Para la purificación de los cuerpos de inclusión se siguió el protocolo de Rodríguez *et al.* (2008). Para ello, los sedimentos obtenidos de un cultivo de células se resuspendieron en el tampón *B-PER*[®] (Pierce). La muestra se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min, desechando el sobrenadante, que contenía las proteínas solubles bacterianas. El sedimento bacteriano, con los cuerpos de inclusión, se resuspendió de nuevo en tampón *B-PER*[®] (Pierce) y a esta suspensión celular se le añadió lisozima (Sigma-Aldrich), a una concentración final de 200 mg/ml, y 2 mg de desoxirribonucleasa I (ADNasa I; Sigma-Aldrich). La mezcla se incubó a temperatura ambiente hasta su solubilización. Después de la digestión con lisozima y ADNasa I, la mezcla se diluyó con 100 ml de tampón *B-PER*[®] (Pierce) 1:10 y se centrifugó durante 15 min a 12.000 rpm. El sedimento se resuspendió en tampón *B-PER*[®] (Pierce) 1:10 y se centrifugó nuevamente durante 15 min a 12.000 rpm. En este caso, el sedimento se resuspendió en 50 ml de un tampón desnaturalizante (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, 1% Tritón X-100, Urea 5 M y ditiotretitol 5 mM), se agitó y se centrifugó a 12.000 rpm durante otros 15 min. Finalmente, el sedimento se resuspendió en 10 ml de otro tampón desnaturalizante (tampón de unión) compuesto de NaH_2PO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM y

urea 8 M, pH 8,0. A esta solución se le añadieron 2 ml de resina de níquel (*Ni-NTA*) al 50% (Qiagen) y la mezcla se incubó en un agitador orbital a temperatura ambiente durante 30 min. La suspensión de resina se cargó en una columna vacía, se lavó con diez volúmenes de tampón de carga y los polipéptidos retenidos se eluyeron con un tampón Tris-HCl 0,15 M pH 10,5, con imidazol 250 mM. La solución, que contenía la proteína de interés, se dializó progresivamente para eliminar la urea (ver “19. Sistema de diálisis progresiva”).

14. Determinación de la concentración proteica

La determinación de la concentración de las diversas proteínas se realizó mediante el método de Biuret, utilizando el kit comercial *Pierce™ BCA Protein Assay* (Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante. Como estándar se empleó una solución de albúmina, incluida en el kit.

15. Electroforesis unidimensional con geles de SDS-PAGE

Para identificar y comprobar el estado, y peso molecular, de las proteínas se realizaron electroforesis unidimensionales, método desarrollado por Laemmli (1970) y modificado por Thomas y Kornberg (1978). Para ello, se utilizaron como soporte geles discontinuos de acrilamida (gel concentrador y gel separador) entre 10% y 18%, dependiendo del tamaño molecular de la proteína en estudio. Además, se empleó SDS como detergente desnaturalizante de las proteínas que confiere, a su vez, una densidad de carga global negativa permitiendo separarlas según su tamaño molecular.

Por otro lado, antes de la electroforesis, las muestras de proteínas se sometieron a condiciones reductoras mediante un tampón de carga comercial *2X Laemmli Sample Buffer* (Bio-Rad) y desnaturalización a 100°C durante 5 min en presencia del agente reductor β -Mercaptoetanol (Millipore).

Las electroforesis se llevaron a cabo con el sistema de electroforesis vertical *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (Bio-Rad), a un voltaje constante de 160 V, en un tampón Tris-glicina (Tris 25 mM, Glicina 190 mM y SDS al 1%; pH 8,3). Para la estimación del peso molecular, se emplearon como marcador para geles teñidos posteriormente con azul de Coomassie, *SigmaMarker* (rango de peso molecular de 6,500-200,000; Sigma-Aldrich), y para geles destinados a inmunotransferencia, *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™* (Bio-Rad Laboratories). Cuando fue necesario, las proteínas separadas electroforéticamente se tiñeron con el reactivo *Coomassie® Brilliant blue G 250* (Merck) en 10% de ácido acético y 40% de metanol, durante 30 min a temperatura ambiente. Los geles se destiñeron en 10% de ácido acético, 50% de metanol y 40% de agua destilada.

16. Electroforesis bidimensional con geles de SDS-PAGE

Permite la separación de las proteínas en base a su punto isoelectrónico, en gradientes de pH inmovilizados, y a su tamaño o peso molecular en presencia de SDS. Para visualizar las proteínas en el gel, se empleó Coomassie coloidal como método de tinción. Las imágenes de los geles se obtuvieron en un escáner BioRad GS-800 con el software Quantity One.

Este procedimiento se realizó en colaboración con el Centro de Apoyo a la Investigación (CAI) de Genómica y Proteómica, Unidad de Proteómica, Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Brevemente, las muestras a procesar se trataron con el kit comercial (*2D Clean-up kit*, GE Healthcare) con el fin de precipitar las proteínas de estas muestras; después el precipitado se resuspendió en el tampón de carga de isoelectroenfoque (IEF) (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2%). Antes de iniciar el procedimiento, a 50 µg de proteína se añadió un 1% de agente reductor (*DeStreak*, GE Healthcare) y un 2% de anfólitos (*IPG buffer* pH 3-11 NL, GE Healthcare), a continuación, se realizó la IEF sobre una tira de 7 cm de gel de poliacrilamida con gradiente de pH inmovilizado, no lineal, 3-11 (*Immobiline DryStrip* pH 3-11 NL, 7 cm, GE Healthcare). Las condiciones de trabajo de IEF fueron: 30 min a 300 V, 30 min en gradiente hasta 1000 V, 1 h 20 min en gradiente hasta 5000 V y 30 min a 5000 V, acumulando unos 5 KWh. Terminado el fraccionamiento, las tiras se equilibraron en una solución de urea 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, 50 mM Tris pH 6,5, primero con DTT 2% durante 12 minutos y posteriormente con iodoacetamida 2,5%, y trazas de azul de bromofenol, durante 5 minutos. Para la electroforesis en segunda dimensión, las tiras se dispusieron en un gel SDS-PAGE 10% en tampón *Laemmli electrophoresis running* (250 mM Tris, 1,92 M Glicina y 1% SDS); el fraccionamiento de las proteínas se llevó a cabo a 100 V, hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzó el final del gel. Por último, el gel de poliacrilamida se separó de las tiras IEF, y las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (BioRad) en un sistema comercial de electroblotting húmedo (*Mini Trans-Blot cell*, BioRad) en tampón Towbins (0,025 M Tris, 0,192 M glicina, 20% Metanol) durante dos horas a 4°C.

17. Estudios de Proteómica

Los estudios de proteómica se realizaron en colaboración con el Centro de Apoyo a la Investigación (CAI) de Genómica y Proteómica, Unidad de Proteómica, Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. A continuación, se detalla brevemente las etapas que se distinguen en el procedimiento completo utilizado.

17.1 Digestión con tripsina en gel

Los *spots* proteicos del gel fueron reducidos mediante incubación, 30 min a 56°C, con ditioneitol (DTT) a una concentración final 10mM; seguidamente, se realizó su alquilación con iodoacetamida a una concentración final de 55mM, a través de incubación a temperatura ambiente durante 15 min en oscuridad. Después, la digestión se realizó con tripsina bovina (*Trypsin sequencing grade*, Roche), a una concentración de 12,5 ng/μl en bicarbonato amónico 25 mM, y se incubó toda la noche a 37°C.

17.2 Aplicación en Placa de MALDI

Un microlitro de los péptidos obtenidos de cada una de las muestras se depositó en un pocillo de la placa porta-muestras de MALDI y se dejó secar al aire a temperatura ambiente. Entonces, se añadió 0.6 μl de matriz (*α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid*, Sigma) a cada pocillo, a una concentración de 3 mg/ml en 50% acetonitrilo y 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA); se dejó secar antes de introducir la placa para su análisis en el espectrómetro de masas.

17.3 Adquisición de huella peptídica (espectro MS) y de espectros de fragmentación de péptidos (MS/MS)

El análisis de masas se realizó en un espectrómetro de masas en tándem, *4800 Plus Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF* (Applied Biosystems, MDS Sciex) equipado con un láser de Nitrogeno (*Nitrogen laser diode-pumped Nd: YAD 355 nm*), extracción retardada y reflector. El equipo operó en modo reflector positivo con un voltaje de aceleración de 20.000 V para la adquisición de los espectros MS. Todos los espectros fueron calibrados internamente utilizando los valores de relación masa/carga (m/z) conocidos de los péptidos procedentes de la autólisis de la tripsina. Como resultado de este primer análisis de masas se obtuvo un espectro MS o huella peptídica de la proteína (*PMF: peptide mass fingerprint*).

En el espectro MS se seleccionaron péptidos precursores, con el fin de confirmar sus secuencias de aminoácidos (aa), intentando que tuvieran buena señal de intensidad y que estuvieran separados de otros péptidos como mínimo en ± 4 Da (ventana de masa) para su aislamiento. Cada péptido se estudió en un análisis independiente, se fragmentaron por colisión con gas atmosférico (*Collision Induced Dissociation, CID*) mediante el método de operación de *1Kv ion reflector* en modo positivo.

17.4 Identificación por huella peptídica combinada con MS/MS

La identificación de las proteínas se realizó con el algoritmo de búsqueda MASCOT v 2.3 a través del software *Global Protein Server* (GPS) v. 3.6 (ABSCIEX), en la base de datos de NCBI (fecha 08/02/2016; 79581714 secuencias) con restricción taxonómica a Metazoa (10328022 secuencias) y en una base de datos de un transcriptoma de *Anisakis* MH-E2 (Perteguer, datos no publicados), cuyos contigs fueron traducidos en sus seis posibles marcos de lectura. En ambos casos se utilizaron los siguientes parámetros de búsqueda: tripsina, carbamidometilación de cisteínas como modificación fija, oxidación de metioninas como modificación variable, la tolerancia del error para la masa del precursor 100 ppm y la tolerancia en las masas de los fragmentos (MS/MS) de 0.3 Da.

Combinando el espectro MS y los espectros MS/MS obtenidos de la fragmentación de precursores en la búsqueda, se identificaron las proteínas presentes en los *spots* seleccionados.

18. Western blotting

Para la inmunodetección de los antígenos en estudio por *western blotting*, se siguieron las indicaciones descritas por Sambrook y Russell (2001). Las proteínas se separaron por electroforesis SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con un sistema comercial de transferencia en formato semiseco (*Fastblot B33/B34*; Biometra) durante 1 h a 100 V. Para los estudios de 54roteómica, el proceso se describe en el apartado 17 de esta sección. En este último caso, antes del bloqueo se realizó un proceso de activación de la membrana con metanol, en agitador oscilante, hasta que la membrana se empapó. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS con el fin de eliminar los restos de metanol.

El bloqueo se realizó con leche desnatada en polvo al 5% en PBS, a 4°C durante toda la noche. Tras varios lavados con PBS-Tween 0,3%, las membranas se incubaron con un anticuerpo primario. Una vez realizados 3 lavados, después de la incubación anterior, se trataron con el anticuerpo secundario (1 ó 2 seguidos, según protocolo) para posteriormente llevar a cabo la detección colorimétrica. El revelado de las membranas correspondiente a la inmunodetección de los antígenos en estudio se realizó con 4-cloro-1-naftol / tetrahidrocloreto de 3,3'-diaminobencidina (*CN/DAB Substrate Kit*; PIERCE) como sustratos de la peroxidasa, mientras que para los estudios de 54roteómica se empleó una solución de 3,3'-diaminobencidina 0,5 mg/ml (*DAB*; Sigma-Aldrich) con peróxido de hidrógeno al 0,05% en PBS. Los anticuerpos se diluyeron en PBS-Tween 0,3% con leche descremada al 1%. Los anticuerpos, dilución y tiempo de incubación empleados en los ensayos de *western blotting* en el presente trabajo, se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones utilizadas en *western blotting* para verificar los procesos de purificación y diagnóstico

Verificación de procesos de purificación					
Anticuerpo primario			Anticuerpo secundario		
Anticuerpo	Nombre comercial (dilución)	Condiciones de incubación	Anticuerpo	Nombre comercial (dilución)	Condiciones de incubación
Monoclonal contra histidina	<i>His-tag Mouse AcM (HRP Conjugate)</i> ; Cell Signaling Technology (1/3000)	1 h a Tª ambiente	<i>Anticuerpos anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa</i>	<i>Anti-mouse IgG, HRP-linked antibody</i> ; Cell Signaling Technology (1/4000)	1 h a Tª ambiente
Proteómica					
Anticuerpo primario			Anticuerpo secundario		
Anticuerpo	Nombre comercial (dilución)	Condiciones de incubación	Anticuerpo	Nombre comercial (dilución)	Condiciones de incubación
Sueros de pacientes	Sueros diluidos en PBS-Tween 0,3% y 5% de leche (1/2)	3 h a Tª ambiente o 4°C ON	Anti-IgE humana de ratón Anticuerpos de cabra anti-IgG1 de ratón conjugado con peroxidasa (HRP)	IgG1κ, E21A11 (INGENASA); (1/500) Goat anti-mouse IgG1 (γ1), HRP conjugate (<i>Molecular Probes Inc.</i>) (1/500)	3 h a Tª ambiente o 4°C ON 2 h a Tª ambiente

19. Sistema de diálisis progresiva

La diálisis progresiva se utilizó a continuación de la purificación de las proteínas en condiciones desnaturalizantes. Las proteínas se dializaron en membranas de diálisis, *Slide-A-Lyzer™ Dialysis Cassettes* (Thermo Scientific Pierce), frente al tampón desnaturalizante (20 mM Tris-HCL, 500 mM NaCl, 6 M Urea, 0,4 mM L-Arginina, 1% Polietilenglicol (PEG8000), pH8.0) a 4°C. Cada 8 h, se realizaron cambios de tampón, disminuyendo la concentración de urea (5 M; 4,5 M; 4 M; 3,5 M; 3 M; 2,5 M; 2 M; 1,5 M; 1 M; 0,75 M; 0,5 M; 0,25 M; 0 M), asegurando que la disminución de la concentración de la misma se efectuara lentamente. Finalmente, la proteína renaturalizada se dializó en PBS durante 24 h a 4°C y en agitación continua.

20. Programas para el análisis bioinformático

20.1 Secuencias

Las secuencias obtenidas se editaron y analizaron con el paquete *DNASTAR* (*Lasergene*). Después se compararon tanto con los bancos de datos *GenBank*/algoritmo *BLAST* (Altschul *et al.*, 1997), *EMBL*/algoritmo *FASTA* (Pearson y Lipman, 1988) y *SWISSPROT* (Boechmann *et al.*, 2003), así como con los datos generados con los dos tipos de ensamblajes de la base de datos MD de transcritos del parásito *A. simplex*.

20.2 Proteínas

El análisis de las características de las proteínas se realizó con el programa *Protean* (*Lasergene*) y el alineamiento múltiple de las mismas mediante *MultAlin* (Corpet F, 1988; <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Para facilitar la comprensión de la estructura primaria de las proteínas se utilizó la herramienta bioinformática *T-Coffee*. Para la identificación de péptido señal se usó el programa *SignalP* 4.1 (Nielsen *et al.*, 1997; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) y para la predicción de sitios de N-glicosilación, *NetNGlyc* 1.0 Server (DTU CBS; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

20.3 Alergenos

En la aplicación de programas informáticos para la búsqueda de alergenos de *A. simplex* s.l. se utilizaron las siguientes bases de datos de moléculas alergénicas: *Allergome* (Scala M, 2006; <http://www.allergome.org>), *Allermatch* (Fiers *et al.*, 2004; <http://allermatch.org>), *FARRP* (*Food Allergy Research and Resource Program allergen database administered by the University of Nebraska, Lincoln*; Goodman, 2008; <http://www.allergenonline.com>) y *Structural Database of Allergenic Proteins* (*SDAP*; Ivanciuc *et al.*, 2002, 2003; <http://fermi.utmb.edu/SDAP>). Para la identificación de las familias de alergenos de las proteínas identificadas se utilizó la base de datos *AllFam* (Radauer *et al.*, 2008; <http://www.meduniwien.ac.at/allfam/>).

En la tabla 7, se resumen las principales bases de datos y herramientas bioinformáticas empleadas para el análisis de las diferentes secuencias.

Tabla 7. Resumen de bases de datos y herramientas bioinformáticas utilizadas para el análisis de secuencias

Bases de datos				
De genes públicas	De genes MH	Alergenos		ES
GenBank Sanger	MH-E1 MH-E2	Allermatch Allergome FARRP SDAP AllFam	SignalP 3.0 SecretomeP TargetP TMHMM	
Herramientas bioinformáticas				
Alineamiento múltiple de secuencias	Búsqueda de similitudes entre secuencias	Diseño de cebadores	Editor de secuencias	Herramientas para análisis de proteínas
MultAlin Seqman MegAlign T-Coffee	BLAST y sus variantes	PrimerSelect	EditSeq Sequence Massager	Protean ExPASy NetNGlyc

20.4 Búsqueda de posibles epitopos IgE/IgG en los nuevos alergenicos descritos

Se buscaron posibles epitopos de tipo IgE/IgG en los nuevos alergenicos identificados en los ensayos de proteómica. Para ello se utilizó el índice de similitud de distancia de propiedades (*property distance*; PD), que se obtiene calculando la similitud de las dos secuencias comparadas y las propiedades fisicoquímicas de ambas. En el presente trabajo solo se hicieron comparaciones con epitopos de alergenicos que habían sido previamente caracterizados experimentalmente y cuyas secuencias presentaron similitud con los alergenicos descritos en el presente trabajo. La información de los mismos, así como el enlace para los cálculos, se consiguieron a partir de la base de datos estructural de proteínas alérgicas *SDAP* (*Structural Database of Allergenic Proteins*, <http://fermi.utmb.edu/SDAP>).

RESULTADOS

1. Búsqueda de alérgenos de *A. simplex* s.l. mediante análisis “in silico”

1.1 Construcción y ensamblado del transcriptoma MH de *A. simplex* s.l.

Se obtuvieron un total de 37.466.832 de lecturas pareadas, con un tamaño de 101 nt y un contenido en GC del 38%. Tras el filtrado, estas se redujeron a 4.366.832 lecturas de calidad, con un tamaño de 101 nt y un contenido en GC del 40%.

Las lecturas obtenidas fueron ensambladas “de novo” (E1) en 39.031 *contigs*, de los cuales 39.026 fueron identificados como transcritos mediante *BLAST*, utilizando un valor de corte de 10^{-6} . En la figura 3, se puede observar un ejemplo de los datos obtenidos para el ensamblaje de un *contig* (CL1Contig2545).

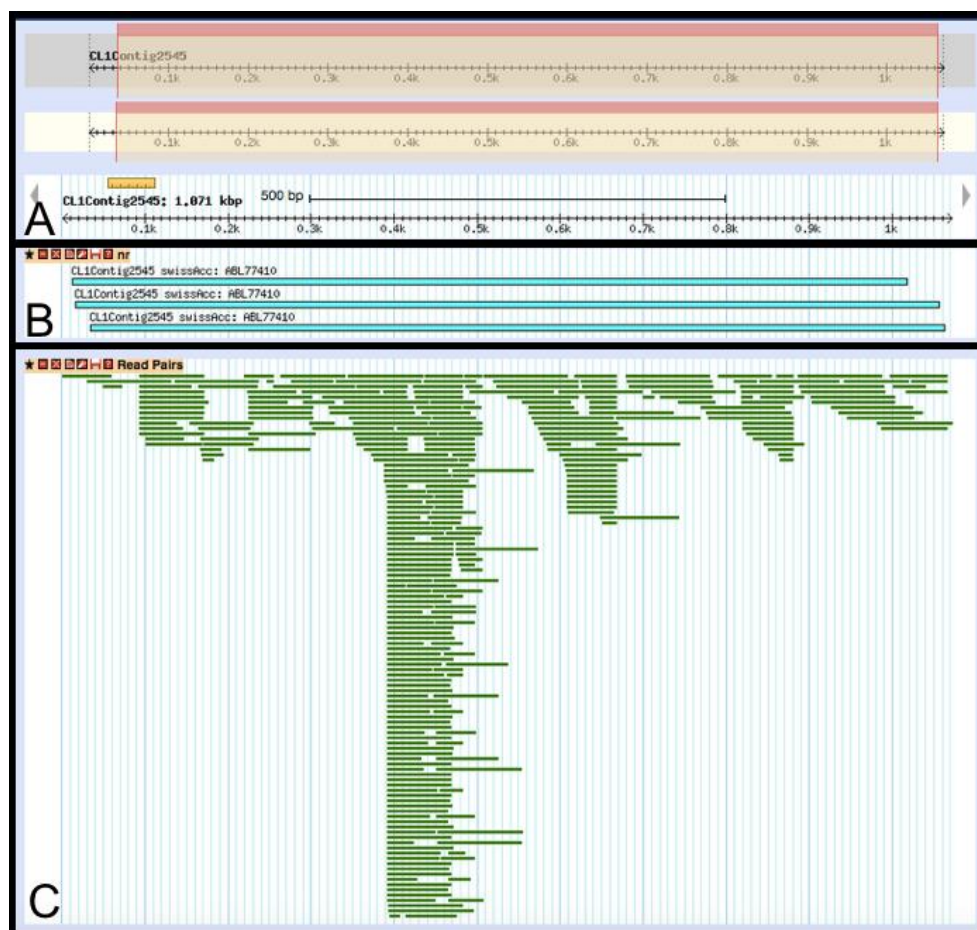


Figura 3. Resultados obtenidos en el ensamblaje del CL1Contig2545

A: corresponde a la representación del tamaño del *contig* expresado en kb. B: representa los números de accesos a Uniprot de secuencias aminoacídicas no redundantes que muestran similitud con el *contig*. C: incluye las diferentes lecturas obtenidas para la construcción de este *contig*.

En la figura 4, se observa que el porcentaje de similitud de las secuencias va del 40 hasta 97%, aproximadamente, para luego decaer. Se evidencia, además, un pico a nivel de 100%, que se corresponde a patrones de secuencia con 100% de similitud.

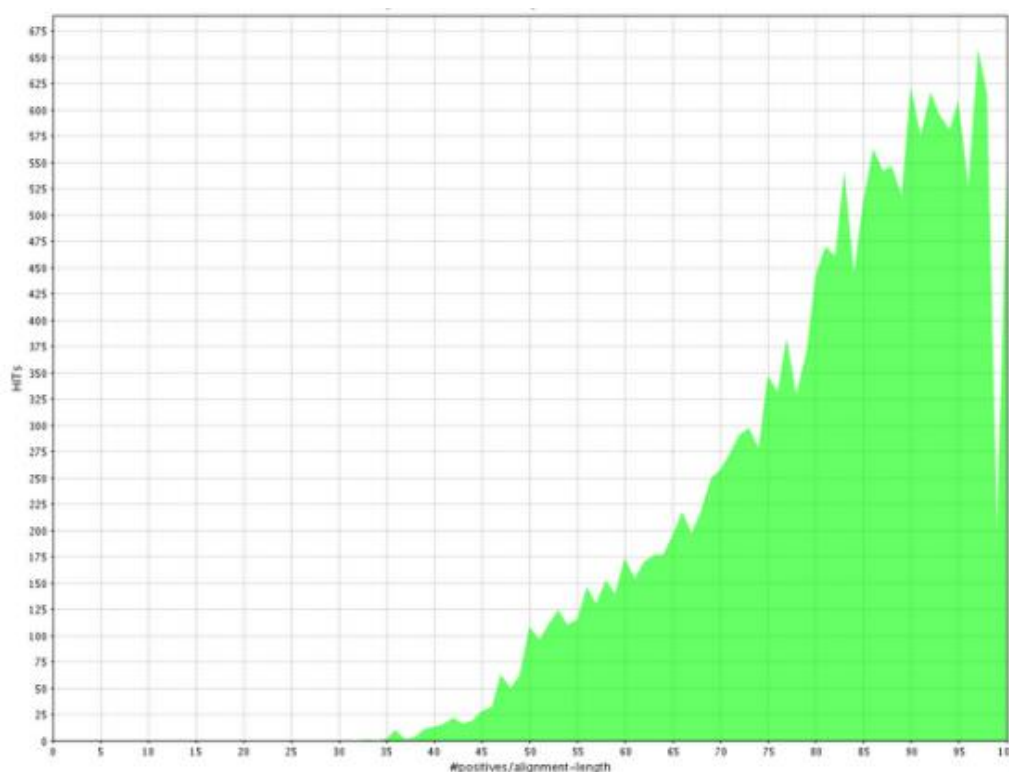


Figura 4. Distribución de similitud de las secuencias

Se representan "hits" positivos frente a la longitud de los alineamientos

Otro aspecto importante a considerar, es la similitud que presentan las secuencias del transcriptoma de *A. simplex* con respecto a los genes de otras especies descritos en las bases de datos en el año 2014, momento en el que se realizó este análisis. La figura 5, evidencia que el nematodo *A.suum* es la especie con más secuencias similares con *A. simplex*, seguida de los nematodos *Loa loa* y *Brugia malayi*.

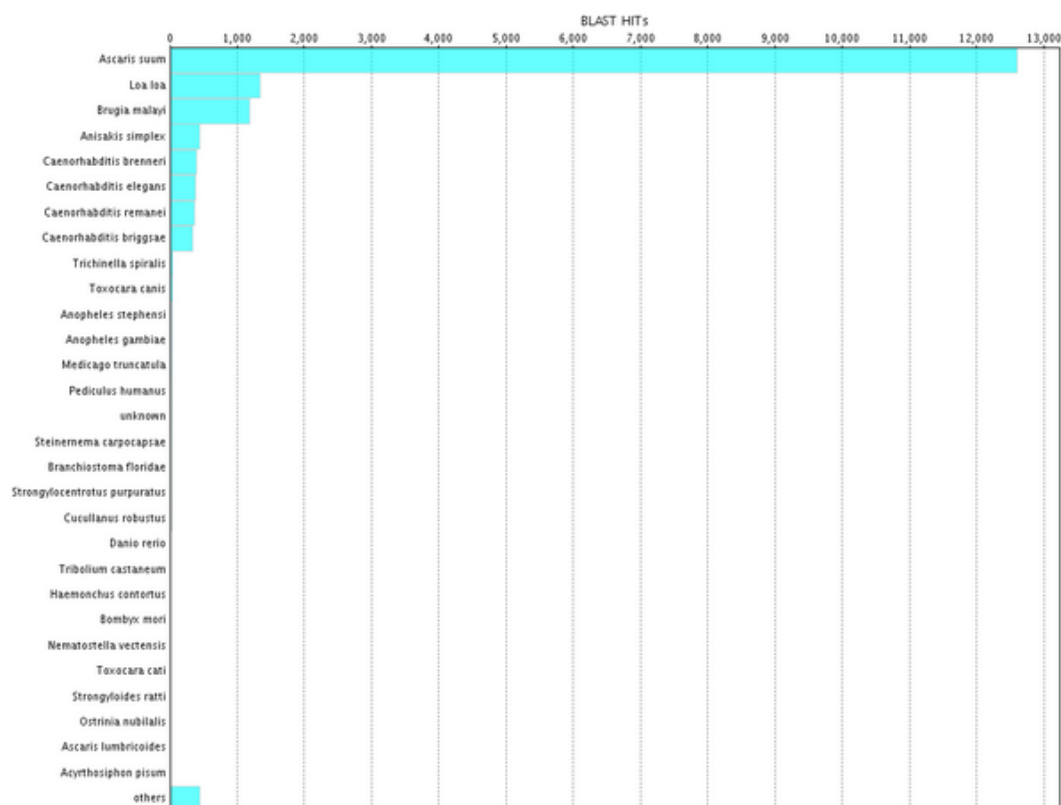


Figura 5. Distribución de especies con respecto a *A. simplex*

Se representan los hits obtenidos en *BLAST* por especie en orden decreciente

1.2 Predicción de regiones con secuencias de ADN codificante (CDS)

De los 39.031 *contigs* ensamblados, se identificaron 22.760 *contigs* con regiones CDS ≥ 30 aminoácidos mediante *GeneID*.

1.3 Anotación funcional de proteínas

De los 22.760 *contigs* con CDS identificados, se anotaron 10.042 *contigs* con un total de 32.839 términos asignados mediante GO. Sólo 2.508 *contigs*, de los 39.021 ensamblados, no fueron anotados. Además, se asignaron 2.873 códigos de enzimas a 2.657 secuencias. Para la anotación funcional se utilizaron las herramientas *Blast2GO* y *KEGG*, *Annex*, indicadas en el apartado " 5. Primer ensamblaje "de novo" (E1) y anotación del transcriptoma de *A. simplex* s.s.", de la sección de Material y Métodos.

Al analizar los datos de ontología génica se observó que el proceso biológico más representado fue el de óxido-reducción, la función molecular la unión a ATP y el componente celular la proteína integral de membrana (figura 6).

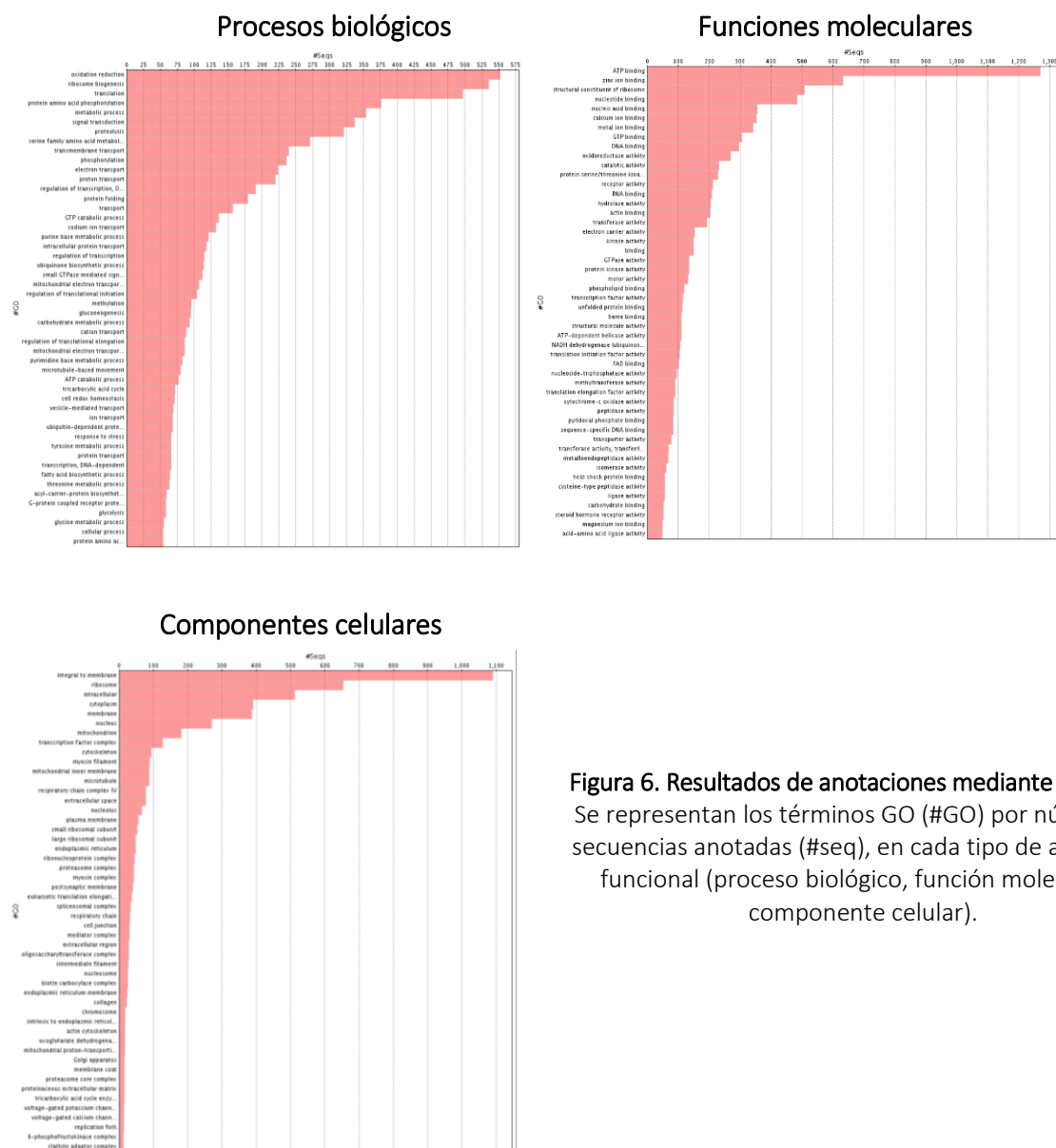


Figura 6. Resultados de anotaciones mediante Blast2GO
Se representan los términos GO (#GO) por número de secuencias anotadas (#seq), en cada tipo de anotación funcional (proceso biológico, función molecular y componente celular).

Por lo que se refiere al análisis de dominios, sólo 8 secuencias tuvieron resultados con *InterProScan*, de las cuales 5 se anotaron con términos GO. En cambio, con la función *Annex*, se logró incrementar el número de términos GO, con 4.245 nuevos términos a los 28.594, previamente asignados (figura 7).

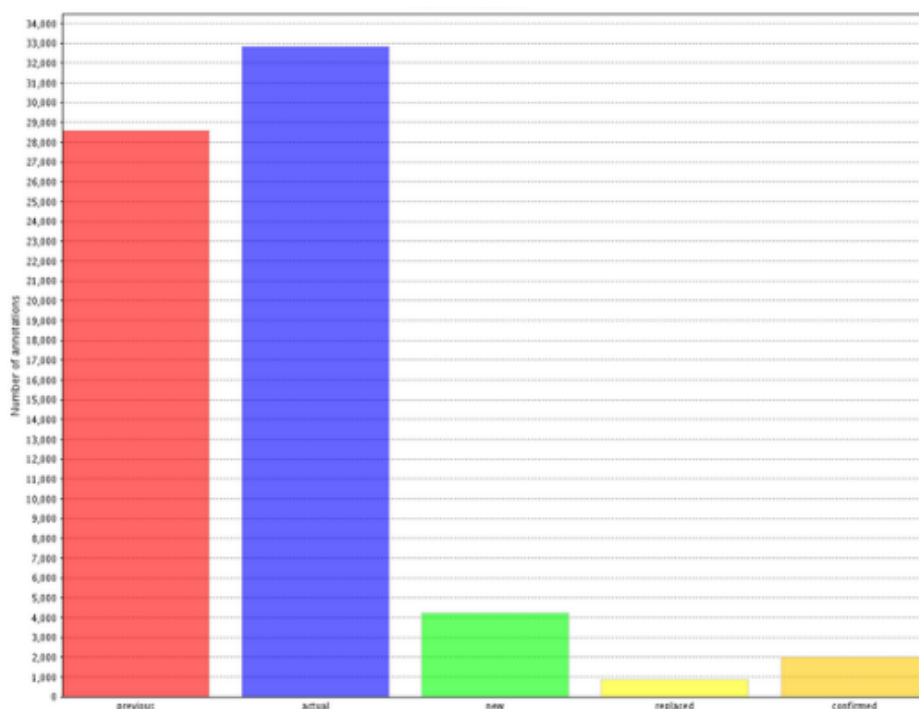


Figura 7. Resultados obtenidos con *Annex*

Rojo: corresponden a los 28.594 términos GO originales. Azul: términos previos (28.594) más los asignados mediante *Annex* (4.245). Verde: términos nuevos (4.245). Amarillo claro: 872 términos específicos que reemplazaron términos generales previos. Amarillo oscuro: 2.030 términos previos confirmados por *Annex*.

1.4 Predicción de proteínas de ES

Para la predicción de proteínas potencialmente ES se aplicaron los criterios que se indican en el apartado "7.1 Predicción de proteínas de ES", de la sección de Material y Métodos. Dentro de los 22.760 *contigs* identificados como posibles CDS, 1.081 *contigs* (4,7%) se predijeron como proteínas de secreción clásica al aplicar el programa *SignalP* (Bendtsen *et al.*, 2004a). El resto de los *contigs* (21.679 *contigs*; 95,3%) que se suponían proteínas no secretoras clásicas, se procesaron mediante el programa *SecretomeP* (Bendtsen *et al.*, 2004b), encontrándose 928 *contigs* (4,1%) como proteínas secretoras por vía no clásica. Los *contigs* anotados inicialmente como proteínas de ES, tanto clásicas como no clásicas, resultaron ser 2.009 (8,8%). Además, se investigaron cuáles de los 22.760 *contigs* pertenecían a proteínas mitocondriales mediante *TargetP* (Emanuelsson *et al.*, 2000) identificándose 154 (0,7%). Así mismo, mediante análisis con el programa *TMHMM* (Krogh *et al.*, 2001) se predijeron un total de 2.794 (12,3%) proteínas transmembrana. Finalmente, se compararon ambos grupos para eliminar las proteínas transmembrana o mitocondriales del grupo de las consideradas previamente como secretoras, obteniéndose un cómputo final de 1.520 *contigs*.

Según la predicción mediante *Blast2GO* de la localización subcelular, de las proteínas predichas como ES, 8 de ellas se localizaron en la región extracelular (figura 8).

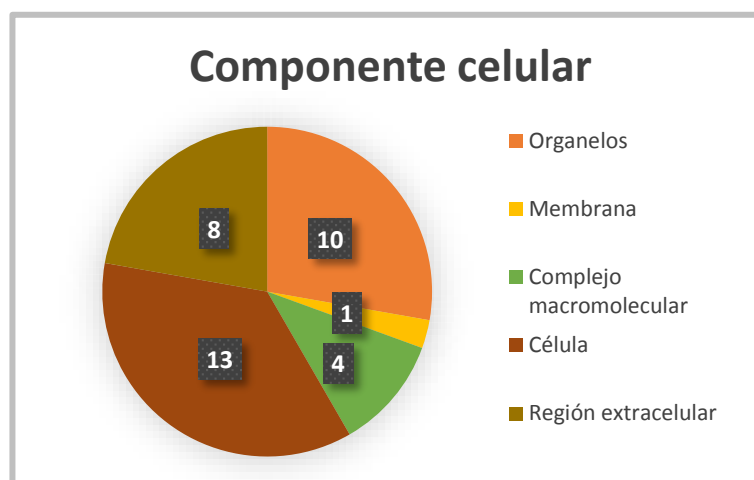


Figura 8. Predicción de los componentes celulares correspondientes a proteínas de ES predichas por *Blast2GO*

1.5 Predicción de proteínas potencialmente alergénicas

En la evaluación se identificaron un total de 556 *contigs* que presentaban similitud ($E\text{-value} < 10^{-5}$) con los alérgenos presentes en las tres bases de datos de alérgenos utilizadas, *Allermatch*, *FARRP* y *Allergome*. Así mismo, de las 1520 proteínas predichas como ES sólo 54 son similares a alérgenos descritos en humanos (figura 9).

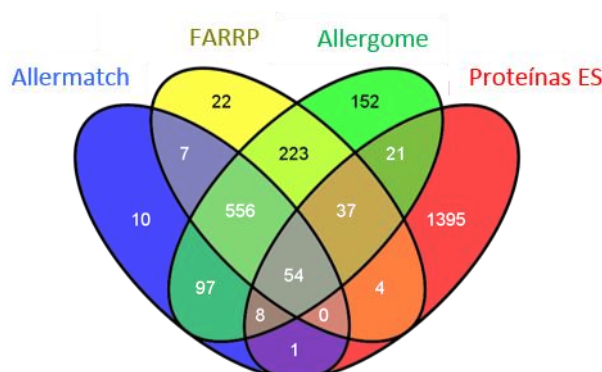


Figura 9. Diagrama de Venn para CDS similares a antígenos de humanos conocidos y predichos como proteínas de ES

De las 54 proteínas identificadas, la función molecular asignada, predicha por *Blast2GO*, con mayor puntuación es la actividad peptidasa (figura 10).

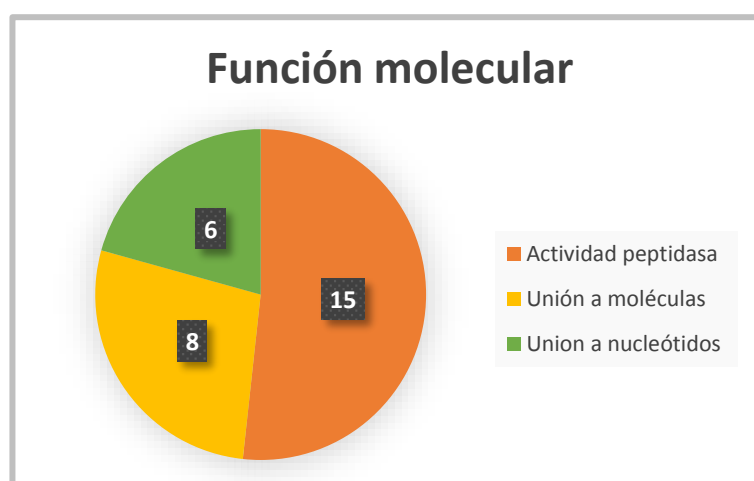


Figura 10. Predicción de las funciones moleculares correspondientes a proteínas de ES predichas por *Blast2GO*

Con el fin de mejorar la identificación de los 54 alérgenos putativos, se compararon con proteínas de ES de otros nematodos y con proteínas similares en humanos, simultáneamente. Se seleccionaron como mejores candidatos aquellos que presentaban mayor identidad (>60%) con nematodos y menor con humanos (<30%); encontrándose que de los 54 alérgenos putativos, 4 proteínas (círculo rojo) cumplen estos criterios (figura 11).

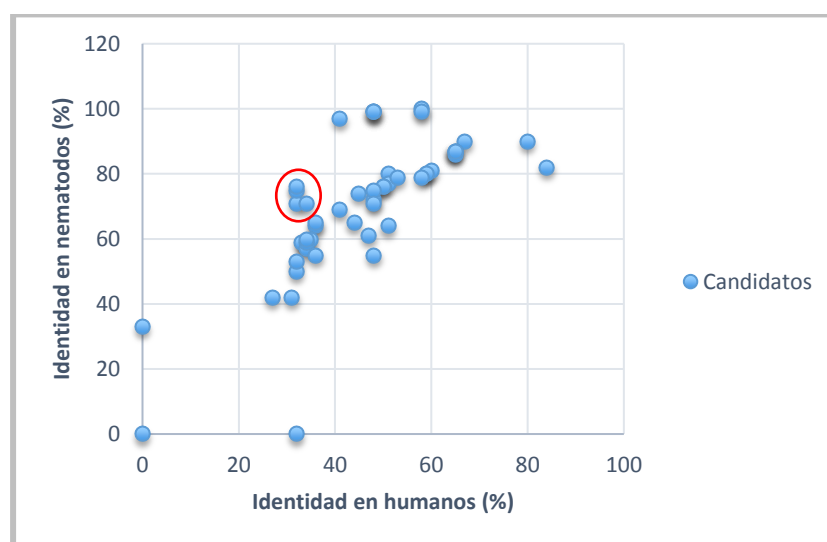


Figura 11. Porcentajes de identidad frente a proteínas de ES de nematodos y humanos, de los candidatos alérgénicos de *A. simplex* correspondiente a proteínas de ES predichos a través de las bases de datos *Allermatch*, *FARRP* y *Allergome*

El eje X corresponde al porcentaje de identidad con respecto a las proteínas humanas mientras que, el eje Y muestra la identidad con proteínas de nematodos. Los candidatos alérgénicos se representan mediante puntos azules, agrupando en un círculo rojo, los que presentan mayor similitud con alérgenos de nematodos, y menor con los de humanos.

Al analizar individualmente las secuencias de las 54 proteínas (contigs) putativas seleccionadas, se vió que algunas correspondían a las mismas proteínas y finalmente se identificaron 24 proteínas diferentes (tabla 8). La comparación de la información de las secuencias obtenidas mediante los dos ensamblados del transcriptoma MH (E1 y E2) y las descritas en los transcriptoma de las bases de datos públicas (Baird *et al.*, 2016) nos permitieron asignar una secuencia consenso a cada uno de los 24 alérgenos predichos (tabla 9).

Tabla 8. Alérgenos de *A. simplex* s.l. obtenidos tras la comparación de las secuencias de los dos ensamblados del transcriptoma MH obtenidos en el presente trabajo y la información en las bases de datos públicas

Se resumen las principales características moleculares de los alérgenos putativos encontrados (AT-1 a AT-24), donde se señalan el número de aminoácidos (aa) que componen los *contigs* obtenidos de la base de datos MH-E1 [E1 (aa)], el *BLAST* obtenido para estas secuencias y los aa que conforman las proteínas obtenidas en la misma [*BLAST* (aa)], el número de aa de la secuencia correspondiente en la base de datos MH-E2 [E2 (aa)] y en la publicada por Baird *et al.*, 2016 [Baird *et al.*, 2016 (aa)]. Además, se incluye el número de aa de la secuencia consenso de cada alérgeno, obtenido tras el análisis mediante las 3 bases de datos [consenso (aa)].

Alérgenos	E1	E1 (aa)	BLAST	BLAST (aa)	E2 (aa)	Baird <i>et al.</i> , 2016 (aa)	Consenso (aa)
AT-1	CL10404Contig1 CL10912Contig1 CL4879Contig1 CL7357Contig1	327 371 327 371	-Proteína Bm7602, isoforma b [<i>B. malayi</i>] -Proteína disulfuro isomerasa TMX3 [<i>T. canis</i>]	442 443	448	221	448
AT-2	CL1683Contig1	254	-Proteína de la familia mano EF [<i>A. suum</i>] -Proteína 5 calmodulina-like [<i>T. canis</i>]	247 247	248	158	247
AT-3	CL1Contig7144 CL1Contig7145 CL1Contig7146 CL1Contig7148 CL1Contig7149	408 408 414 408 368	-Proteína putativa serpin-like ma 3388 [<i>A. suum</i>] -Neuroserpin [<i>T. canis</i>]	367 1050	274 170	368	408
AT-4	CL1Contig5632	81	-Proteasa inhibitoria [<i>A. simplex</i>]	84	59	-	81
AT-5	CL1006Contig1	115	-Fosfatasa ácida lisosomal [<i>A. suum</i>] -Fosfatasa ácida lisosomal [<i>T. canis</i>]	406 477	153	362	387
AT-6	CL13318Contig1 CL1Contig2695 CL1Contig2696	138 656 617	-Proteína C de choque térmico de 70 kDa [<i>A. suum</i>] - Proteína C de choque térmico de 70 kDa [<i>T. canis</i>]	658 673	657	258	657
AT-7	CL1401Contig1	168	-Calmodulina-2 [<i>A. suum</i>]	163	128	158	168
AT-8	CL1Contig226	392	-Proteína hipotética LOAG_03480 [<i>L. loa</i>] -Proteína testicular fosfatasa ácida-like [<i>T. canis</i>]	419 407	285	118	392

AT-9	CL1Contig2910 CL1Contig2911 CL1Contig2912	332 409 409	-Cistein proteinasa Catepsina B-like [A. suum] -Cistein proteinasa Catepsina B-like 6 [T. canis]	398 397	366	312	409
AT-10	CL1Contig3206	231	-Venom alergeno 3 [A. suum] -Venom alergeno 5.02 [T. canis] -Proteína secretada Ancylostoma [T. canis]	226 225 266	226	130	231
AT-11	CL1Contig3914 CL1Contig3915	351 484	-Inhibidor de proteinasa I29 y proteína con dominio peptidasa C1A [Haemonchus contortus] -Catepsina L [T. canis]	463 455	403 138	213	484
AT-12	CL1Contig4440 CL1Contig4441 CL1Contig4442	310 305 315	-Preproteína Catepsina Z1 [T. canis]	307	305	268	305
AT-13	CL1Contig4566 CL1Contig4567	421 424	-Proteína disulfuro isomerasa [A. simplex]	497	498	466	498
AT-14	CL1Contig4916 CL1Contig4917 CL1Contig4918 CL1Contig4919	406 453 409 206	-Catepsina D-like, aspartil proteasa [A. simplex]	453	207	329	453
AT-15	CL1Contig4997	678	-Proteína hipotética [B. malayi] -Poliproteína DVA-1 [T. canis] (región de poliproteína de nematodo alergeno ABA-1).	890 595	58 86	75	678
AT-16	CL1Contig5573	82	-Proteína -1 asociada a activación, parcial [W. bancrofti]	109	226	130	82
AT-17	CL1Contig5594 CL1Contig5605 CL1Contig5609	140 140 146	-Mucina 5B predicha [Tribolium castaneum] - NIT4B hidratasa bifuncional nitrilasa/nitrilo [T. canis]	199 647	69	-	146
AT-18	CL1Contig6950 CL1Contig6951 CL1Contig6952 CL1Contig6953	772 772 666 739	-Endoplasmina [T. canis] -Endoplasmina precursor [B. malayi]	786 789	116 199	735	779
AT-19	CL2282Contig1	114	-Proteína con dominio disulfuro-isomerasa [Necator americanus] -Proteína putativa disulfuro - isomerasa A6 [T. canis]	435 437	-	418	437
AT-20	CL27Contig3	459	-Proteína hipotética Y032_0005g2485 [Ancylostoma ceylanicum] -Aspartil proteasa 6 [T. canis]	429 434	78	361	459
AT-21	CL5061Contig1	166	- Proteína 1 D7-relacionada [Anopheles stephensi]	166	-	-	166
AT-22	CL5628Contig1	168	-Precursor de la proteína salivar corta D7-4 [A. stephensi]	168	-	-	168
AT-23	CL894Contig1	524	- Serin carboxipeptidasa F32A5.3 [T. canis]	2317	252	122	524
AT-24	CL7545Contig1	128			-	-	128

Las secuencias correspondientes a los alérgenos anteriores se muestran a continuación, en la tabla 9.

Tabla 9. Secuencia de los alérgenos obtenidos tras la comparación con las secuencias presentes en las tres bases de datos

Las secuencias corresponden a la secuencia consenso (en aa) obtenida para cada alérgeno incluido en la tabla 8. Se resalta la secuencia del péptido señal (negrita) en las proteína que la presentan y los posibles sitios de N-glicosilación (*sequon*: Asn-Xaa-Ser/Thr); en rojo la asparagina involucrada en la N-glicosilación, mientras que el resto de los aa de la secuencia consenso aparecen en azul.

Nº	Secuencias
AT-1	<p>1 MMSRLSQICAFVVLHLLHFIGISAQAGVSSQVIDLNDKFLQVKHEGLWFVEFYAPWCAHC 60</p> <p>61 KRLMPIWEHVGHALADRNSPVRVAKLDCTRYTTAASTLNIRGYPTIIFFRNGQEMVYEGE 120</p> <p>121 RKKEAMVDFAVKAAGPIVGVIGSASQLSLRHSTKEPFFAFVDSSDEMESTQLYDEYRTL 180</p> <p>181 AQRLESSSSFYRVLHQFLPQTIAIPRLPTVVVFKDATFAVFNSQKGVLDSDWVNAERWSL 240</p> <p>241 MPLVASSNIKEMGNTKLLVLSVINMIERKNVSTSVGRFYAMMTKAAKLIRADERLNPVYQ 300</p> <p>301 FGWMDGSEMANSIVLGAVNQPELLVFNVSSEYYLSGDLSTELTEKSVISFLERIVAGDV 360</p> <p>361 QAMGGRSISQRIKRIAYEVTNNVYEMFRAQPLLTVCLFGVPLAFLSLITYCICSTDFTVD 420</p> <p>421 RDEIYPEDDDDDDDIDLSDAENHQKAD. 447</p>
AT-2	<p>1 MLSQSLITLTLFGICIAAATTSNDDHVVRVESVDEDEDGDKVTFNELEHWHKARANTINDQ 60</p> <p>61 KLRQLFAENDKNRDSALSIAEFVQVAVELGRQPISQTELI FRKIDLNGDGIITLEESQRT 120</p> <p>121 GDPIMSRIMEGVFEIADIDHDGLITLKELATI IENENKPKSKEVKKNENAQRLLALIDAN 180</p> <p>181 SDERLVVSEVHAFANINSKVSEQHVKEAFGHLDQNRDGFITLDELSQLPDKMAELVHFKE 240</p> <p>241 APAVNDN 247</p>
AT-3	<p>1 MAINRGQMCHSASGSVAFLAVLFLCCVHADSDQPCCDLTNMEVAQSDFALDLLRKSVED 60</p> <p>61 PKQSLIISPFSAVALAMTYAGAGGDTYEQMNQILAGGESNEVFNKHFGIEILKGIEINKPE 120</p> <p>121 YTGFEGLDLANKLFIKEGYQLKEAYLKTIREVYGGQLEQVDFLEAAKQANQINWVENQTN 180</p> <p>181 SRIKDLVSADMFNLDLTRMMLVNAIYFNGTWQSQFMDERTKKKTIFYQAADSTREVEMMFNK 240</p> <p>241 DEFPPYENDKVQVLGLPYKGYQVYMYVFLPKDKYGLEEFKSLKGEELLEMISEFDLSYA 300</p> <p>301 MVDLPKFLEKKFGLVKALKKIGIEAFGANANFSGISDDPLKISDVIHKAFIEVNEKGT 360</p> <p>361 EAAAATGMQMTLLSAPMVMEPPVSFIADHPFMFALVKSNTILFIGHY 408</p>
AT-4	<p>1 MFLSTFFLVTMVCVATARYGYPDQCKSNEEYRECGNPCPELPGNGGPFLCAANFVPGCYC 60</p> <p>61 KQGYVRFTTEHGECVPETRCK- 80</p>
AT-5	<p>1 MKITSALYLVIKILLGFDYDGSKMIMASDQLMFVQIVWRHGDRAPEQTYPTDEHQEDAW 60</p> <p>61 PHGFGEITELGMKQQYSLGRLIRERYIEGAEQPLLSPTYNAKEIYVRSTDVNRTLVSAMS 120</p> <p>121 NLAGMYPYGVPGSDYPHIKNSWPAHWTPIPVHTVEFETDHIGNALAKCDRALQLEEQTR 180</p> <p>181 SSKLYQKYAMDNKAFFEFLESEKTMHVWLENIYMINDIHLVEKLYNLSQPDWLTDKVAAK 240</p> <p>241 ILNLTEVADFEKFGISKPYLPELIKLRGGSLLKAIVEKMNKIRCSVADRQADPNCRWMR 300</p> <p>301 SLKYYAYSADHTTIAALLTTFGDEKKVLKGGLPKYTASVAIELWNLTDIGPAVKILFHSA 360</p> <p>361 YHHKYRPITSLTLGCPADSDFCPLPRF 387</p>

AT-6	<p>1 MRTLFLALGTVAFLAVCVFCEEKNSSDKTKLGVLTIGIDLGTYSVGVFKNGRVEI IANDQ 60</p> <p>61 GNRITPSYVAFTADTGERLIGDAAKNQLTINPENTVFDKRLVGRKFNDKSVQEDMKVWP 120</p> <p>121 FKLINKDNKPYVQLEVRKKVTTFTPEEISAMVLGKMKQIAEDYLGKEVKNNAVTVPAYFT 180</p> <p>181 DAQRQATKDAGAIAGLNLVRIINEPTAAAIAAYGLDKKEGERNILVFDLGGGTDFDVSVLTI 240</p> <p>241 DNGVFEVLATNGDTHLGGEDFDQVRMEYFIKLYKKKTGKDIRKDSRAVQKLRREVEKAKR 300</p> <p>301 ALSSQHQRLEVESLYDGEDFSETLTRAKFEELNMDLFRETMPKPVAKVLSDSLEKKDID 360</p> <p>361 EIVLVGGSTRIPKVQQLIKDFFDGKEPSRGINPDEAVAYGAAGVQAGVISGEENTGDIVLL 420</p> <p>421 DVNPLTMGIETVGGVMTKLINRNTVIPTKKSQIFSTAADNQPTVTIQTIEGERPMTKDNH 480</p> <p>481 LLGKFDLTGIPAPRGVPQIEVTFEIDVNGILHVTAEDKGTGHKNQITITNDQNRLSPED 540</p> <p>541 IERMINADKYAEDDKVKKEQVEARNELEGYAYSLKNQIGDKEKLGKGLDDDDKKTIEEA 600</p> <p>601 VDETIAWLDSHKEASVEDLQQQKKDLEAKVQPIVSKLYKDAGGAPPPTEDKDRDEL. 656</p>
AT-7	<p>1 MDGTRKSSTFEQLENSRLTQIRDAFSVFD RDGDGRITVDELGEVMLS LGHEHPAENELKRM 60</p> <p>61 ISEFDEDCNGTIEMDEFIRLMARKARDREASEHELRRVFREFDKDGDGYISVDDLQSLMA 120</p> <p>121 HHGRSITQQEAVQMLNEADLDKDLVNYDDFAEIIIMSGRSADENDERR 168</p>
AT-8	<p>1 MHITLLQVFLLLFTAAFQLTAVECLREL VYVQAIWRHGDRAPTKYPPNDKYTEQYWPRG 60</p> <p>61 WGHLTSTGMKQLYRLGHFFRQRYGNYIGSRYNVSELEVMATSADRAIESAQAMLRLGLFPV 120</p> <p>121 TNETKWLEGEVWQPVFPFHSTTPGESDPLIRPNKYDCPKYYKIFESHFDLLDQQLQNEYGD 180</p> <p>181 VFRYLKEVSGFRKVGLAEVLRIHNVKLELLHMTQPDWLYKKWPNNHNYDTTYEIVQKIKL 240</p> <p>241 RSRLNQFNSPTKAMLRGGLLAGHFLQRALNVSKGVRLSPSKMMLYSSHDVTIQPLLHALG 300</p> <p>301 INNDDLVPYAGCLIMEVYKTWAGKFEVEFFYKNDTTNAIVYPLTIPGCSTRCEVQKLWQL 360</p> <p>361 KSADVYMNVDQLEKACGLVGHTTITISFFDFL 392</p>
AT-9	<p>1 MKCVLLLAVVCVVITNAHRTHPLHHHHGHRSRSTDNSDDYKPNQYYGGRSVLDEFDRDK 60</p> <p>61 ISYEAELTGQELVDYVNSHQKLWKAKLNTKFADYSRRVQYGLMGVKHVYLSAEDKKHLS 120</p> <p>121 PTRRLDMYIPEQFDAREHWDYCNSLKNIRDQSACGSCWAFGAVEAMSDRICIASKGKIQV 180</p> <p>181 SLSADDLLSCCHSCGFGCDGGEPTAAWKYVWKQGI V TGSNFTLKEGCKPYFPFPCEHHSN 240</p> <p>241 KTHYDPCKHDLYPTPKCEKKCVSTYTARSYEDDKFYGSDSYGVEDDVESIQEILTHGPV 300</p> <p>301 EVAFEVYDDFLAYDSGIYVHTGGKIGGGHAVKMLGWGVEQGVYPYWLANSWNTDWGENGF 360</p> <p>361 FRILRGVDECGIESGVVAGIPKLNRTHKQFYRRFRLDDAEDSDENDSLF 409</p>
AT-10	<p>1 MPALFALLGFLPLIVTAQWDCPNSLLTPAAKQAI VAKHNELRETIVHGKALRKGDVPIPK 60</p> <p>61 AANMYAMKWDCDLEKQSQEWVNRVCFQHSPEFRHAGENIFASSTGSLGDLGKYGV TAS 120</p> <p>121 EAWWSELKQVTDDMIKIENNEVPFGGP IFGVAGHWQMAWGETTKVGCIGQNCTRGTSGW 180</p> <p>181 KQVNVVCEYRNQGNFWSAPIYKIGDGCHQDSCTSFQGSKCDTSTNLCLSP 231</p>
AT-11	<p>1 MLLNVALLIGFALTACAEGNVGEYKDIDKVTDKQYKEMSWRAIDKLNQQSNDAYHWILVE 60</p> <p>61 VRKARIQLVAGYKYTIDAI IAQSNCPKNKVKFSELRSTHCRSRKDAIRMACTFDIYRREW 120</p> <p>121 DNVEEITVQNCSQHQLPSAHNMHGEKMHVSSGEHDSAMSDMFDRWAARHHIKPKDYGLW 180</p> <p>181 NLFGAFAERYNRTYTTKKEMLRRFRIYKRNRQRTAKFWQSNELGTAVYGETQYSDMSQEEF 240</p> <p>241 KKLILPYIWQTPRVPSKMADFEFVGSTDPIDPQFDWREKNAVTDVKNQGACGSCWAFSV 300</p> <p>301 TGNIEGAWAIKTGKLVSLSEQELVDCDVVDEGCNGGLPLNAYKEIIRMGGLETEKDYPYD 360</p> <p>361 GRGERCHLVRQEIAVYINDSVLPKDEQKMAEWLVAKGPISIGINANPLQFYRHGIAHPW 420</p> <p>421 KILCSPTHLDHGV LIVGYGVEGDKPFWIVKNSWGARWGEQGYFRLYRGKNVCGVQQMATS 480</p> <p>481 AVIH 484</p>
AT-12	<p>1 MQGRLVFLLLIIAVALNEAKKYRKL AHQKRNRYNESPCYKKT SRIYEHRLLP RQYDDPDY 60</p> <p>61 DFDALPISFDWRNKDGVNYAGIDRNQH IPRYCGSCWAFGATSALADRFNIKRKNAPQVH 120</p> <p>121 LSVQEVIDCGGTGSCGEGGPGGVYKFAHDIGIPHETCN NYQARDGKCTPYNKGSCWPDD 180</p> <p>181 CFSISNTLYKVGDYGRVSTINKMKAEIFENGPIACGIAATKKFETYSGGIYKEETSEGI 240</p> <p>241 DHII SVYGWGIQHDSGVYPYWIGRNSWGTPWGEDGWFRIVTSEYKHAGSKY NLKIEEDCVW 300</p> <p>301 ADPIV 305</p>

AT-13	<p>1 MYKLVVFGIFAVIAATLAAYEEEDNVIVITKDNLDEVVNGHQFVLVEFYAPWCGHCKALA 60 61 PEYAKAATALKEEGSEIKLAKCDATQHDTVAQKFEVRGYPTLKFFRNGKPTEYGGGRDKA 120 121 SIIAWLKKKKTGPVAKTLETSDVDKDYQESADV VVVVGYFKDVEGADAKAFLEVAQAIDDMP 180 181 FGITSKKEAAEQLEATEEGVILLKKFDEGRNVYDGKLNFDDELKAWIQVNRMPVVSEFTQE 240 241 SASLIFGGDIKSHNLLFISKESADFEKIEKEFREAAAMQFKGKLLFVYINTDVEDNARIME 300 301 FFGLKKTDLPVRLISLDEDMTKYKPDFEITTVNVVKFTSTYLEGKLKPHLMSEIEIPED 360 361 WDKNPVKVLVGKNFDEVARDPKRNVLEFYAPWCGHCKQLAPIWDKLGEKYKDHKDIVIA 420 421 KMDATANEVEDVKVQSYPTIKYFPANSNKVVHYSGERTLEGFVKFLESGGAEGAGMSESD 480 481 KAAAESEREEEGHTEL. 497</p>
AT-14	<p>1 MFRTVALLIFAAFLLADARLQPIHYRSRHVHIHEHNNHQLKRIELHKQTTIREQLFETDS 60 61 WDEYLHRRHLLKKHLQSIANHQFRSLSAGSSSNEIDELLRNYMDAQYGVISITGTPPQN 120 121 FTVIFDTGSSNLWVPSRKCKWTDIACWLHHKYDAAKSSTYKADGRELQIQYGTGSMKGFI 180 181 SLDTVCAELCARDQPF AEATSEPGITFVAAKFDGILGMAFPEIAALNVTPVFN TMVNQQ 240 241 LVAEPVFAFWLNRNPDDEIGGEITFGGTDPKHFVEPIVYAPVTRRAYWQFKMDKISGQDG 300 301 TLACSDGCQAIADTGTSLIAGPKQQVQLIQYIGAEP LFSGEYMI PCDKVPSLPDVSLVI 360 361 GGKTFSLTSLDYVLNTKAGKSICLSGFMGIDLPERVGQLWILGDVFIGRFYTVFDMGQE 420 421 RVGFAQAKDNHGHFPVGRQVKQYTSYDYDDASAE 453</p>
AT-15	<p>1 MNLVWHFVCLALCVECTLARPPREKVEIAEAFVSAEDDELYEKVKNAEWEVKTERELSMG 60 61 LFDIFRRSSRQRRSYDLHDWMTAEQKDEIRNMERTKIAPEAIRDKILVFYEELSPETKNE 120 121 WDKKYKDHCGEWWKSVASEDVLGELKELRANGDYDRVHEKLAEYRTRLSDPDRAVELWK 180 181 DVC AKLWKVSKKQDKLRLRLRNLETYRRYLSWLSAEQYISIERMKEDGASVQDVHDKITE 240 241 YFYDLPQQQQDSIEEDFRDKCIELLKDVDDQIEHLRTL YRNGEIKMLRTKIDS YFKKL 300 301 TNDHSVTFHRLAAMCKDTWNENGVKTRRRRKIDTAYKEWIGWMS EDMKKEIEDLRNSGSS 360 361 FDEIHAKINAQFDKLEPEKRRELLDFYKQCKAYFSSISTEE EINEMKRLYEAGGQHKVT 420 421 DIINEAIERLPDEKKIHAKKFQKICNDVYYKMKHRKARRDINTLM EKHL SWLTAEQKEEI 480 481 RSMKQEGASNTEIKAKLSMLQQKDDTDRPKAVQKT KESCYAWLKEVATVEEREELERLH 540 541 HRDHSACKKKVREFIRRLPEAKQEI VNRDLDECEQIWIYGGSHDHSSHHHHHHQR RDIDGT 600 601 GKGSASNHHFTLENSMDTHLKWLSPEQKEELLEMKNKGSKKEIQAKVEHYLNQYFQV FQ 660 661 YKINQYFQVFLYNQQIQY 678</p>
AT-16	<p>1 MSALFALLGFLPLIVTAQWDCPNSLLTPAAKQAI VAKHNELRETIVHGKALRKGDVPIPK 60 61 AANMYAMKWDCDLEKQSQEWNRCVFQHSPE SFRHAGENIFASSTGSLGDLGKYGV TAS 120 121 EAWWSELKRVTDDMIKIENNEVPFGGP IFGVAGHWTQMAWGETTKVGC GQINCTRGTS GW 180 181 KQVNVVCEYRNQGNFWSAPIYKIGDGCHQDSDCTSFQGS KCDTSTNLCLSP. 231</p>
AT-17	<p>1 MFLSTFFLVLMVCVATARYGYPDTRCPNMKYKECGTRCPETCADKEPRPCVKICEPGCF 60 61 CKEGYILDRDGGKCI REEDCPPDQCKPNEEYNECGSRCQEKCDYGV PVICTYHCEQGCFC 120 121 KKG YVRLTEDGECVSDTNCLQLRLMI 146</p>
AT-18	<p>1 MASSRTSKAIFVVFILAAVALLPSARVDAEDDIEEPTVKENLAKAKDASKTDDEVVQREE 60 61 EAIKLDGLSVAQMKEIRAKAEQFQFQAEVNRMMKLIINS LYT NKEIFLRELISNASDALD 120 121 KIRLISLTDPEALSATDELSIRIKADRENHLLHVIDTGIGMTHDELVS NLGTIARSGTSE 180 181 FLSKLLDSNAEQQQDLIGQFGVGFYSAFLVADNIAVTSKHND DDQYIWESKSN SFTVVKD 240 241 PRGPTLKRGTQVTLHLKEEAYDFLEPDTLKNLVHRY SQFINFDIYLWQSKTETVEEPVEE 300 301 EQPAEKKAEEEDGKVEEEKEKTKKVEKTTWDWEKVNTVKPIWMRKS GEVEPDEYDEFYK 360 361 SITKDNEKPLAHVHFTAEGEV SFKSILYVPKHGPFDMFQNYGKTAENIRLFVRVFI TDD 420 421 FKDMMPKYLSFIRGIVDSDDLPLNSRET LQQHKLKVIKKKLVRKVLDM LKKMDPESYL 480 481 EFWKEFSTNIKL GIMEDPTNRLSKLLRFQSSNHEEKETT LAAYVERMKEKQDAIFYMA 540 541 GTSRKEVESSPFVERLLKKG YEVLYLTPVD EYTIQAMPEFDGKR FQNVAKEGLVLDGGE 600 601 KSKEMQEQLEKAYAPVTKWLKDKALKDEIEKAVVSQR LTTSPSALVASSY GWSGNMERIM 660 661 KSQAYAKARDASQEFYANQKKTLEINPRHPIVKELLRRVEGDPEDPKALSTAKLLFETAT 720 721 LRSGYVLKDQVGFTSRVEQLLRQSLDIP LDEAIE TEPEVDETTT TSEKAEDVSAEDKE 779</p>

AT-19	<p>1 MVSLRLTVLCFVIGVTVCAALYDGSSDVIELTEINFKNRVLNGDEIWIVEFYAPWCGHCK 60</p> <p>61 SFAPEFSKAAKVLKGLIKVGAVDMTQHQSQVPYNVQGFPTVKIFGANKQKPTDYQGART 120</p> <p>121 AKGLADAGMEELRKTISARLGGKTSSDKGRRSSGSADGKDVVELTDSNFEDLVFHSKDAW 180</p> <p>181 LVEFYAPWCGHCKALKPEWERAASELKGIKLGALDATVHQGMASRFVKGFPPTIKYFAP 240</p> <p>241 GSSESDAVDYDGGRSSSDIVQWSLNKVAENLPAPEVMEATSSSVVEESCKEQLCIVAVL 300</p> <p>301 PHILDCQSKCRNNYIAVLKELSEKFKNMWGIWTEAGKQPELEEAFGMGFGYPAMAAV 360</p> <p>361 NYRKMKFSMLKGSFGKDGINEFLRDLSYGKGQTLVPVKGAEFPKILKVEPWDGKDGEEMPVE 420</p> <p>421 EDIDVSDVDLEDLDTPE 437</p>
AT-20	<p>1 MSESRRILRLILVAFSVVVCVDVDAAHVHRIAVTKHTGQRIKMMREGKWPEYLRQLQVKQS 60</p> <p>61 IAAFNLRSDPAVVRHRVNTNDDLFIYVSNITIGTVSQGITPQRFVRVILDTGSTDIWITDS 120</p> <p>121 NCGRTEAATKQPCFRFCTLIGPLCEFACGKECKEDQSSNDDMCKGKNLFNAYASNTYKK 180</p> <p>181 LNGTWVIEYGTGSASGTYGEDVVRLGDDDGSQLVIPKQAIGQALKISDQYKNDEIDGIV 240</p> <p>241 GLAYTKMDVTEIVPPLLNAWNQHLLDQPIFTVWLEHKGFEESNVPGGMFTYGGFDDHECEF 300</p> <p>301 SNDFVFHPLTSNDYWQFSMRISVGHFYYSATGDYQAFSDTGTSIAIGPHWIIASIAKAL 360</p> <p>361 GGYDAKHGVFVSNCSGITKNIGLKIGGHNYEIEPLNYIVQVDEHTCWLALTQIDGTAFG 420</p> <p>421 GADFILGDPFIRQYCNVHDFYRKRIAFAKAKTPPKHGIN 459</p>
AT-21	<p>1 MLKEAIFISLSALCLVAVVQGGTIKECESKMAASLKKKLCQVRQYKLFETDMYSHIDCC 60</p> <p>61 MKAVDFVEKDGTDGYHKLYELLNNIEHRKHNDINLETGCVGESMDAQANQRAYAFYKCLLK 120</p> <p>121 STSADAFKKAFLRELKANKLPPGTRYSSSEIDQMKKIDDNICKL 166</p>
AT-22	<p>1 MNKLILLTVGLLWCLVSLGQARKESTVEECEKNIPDSLKDRVCELRYTPVASDDMDKHMQ 60</p> <p>61 CILEVVGTVNGNGEVNESELLSSLLQRVDSSVPHAANMKKCVMEASNVGSGKKANTFYTCF 120</p> <p>121 LGTSSSTGFKNADVYNELLRAGKMRLSDPFDVSVVARLIKEIDDGLCG 168</p>
AT-23	<p>1 MGTVHELLLVTFLLVLCHAQTKWNDRITNLPGLTFSPGLEQYSGYLPTKSGTQLHYWV 60</p> <p>61 ESERDPKSDPLILWLNGGPGCSSLVGLFTELGPFRVNYGGKTLFENNISWNKAANI IYLE 120</p> <p>121 GPRDVGYSGKGHVTFNDDDETASGNVDALEAFYERFPEYKNRPFYVGGESYGGVYVPVTS 180</p> <p>181 AEVVKRIKGHKLPHYVNFKGFLIGNGIISFRDQINTIVSLLYYRGIIGKGDYDALQKCKV 240</p> <p>241 NSTKTQALGTCDFSQYIEVQNNGSIVPRPFKDPIKRQCANLVRDYRMEMNTTEIIYNTY 300</p> <p>301 EDCYMDTHARPSLKVVQRSDLKRRMSLMKLSAFDQGQESFIDQGSKLNMGSTDALSGYPCW 360</p> <p>361 MDDAKETYINLPEVRYATHIPKNLPHWTDNCFHVNELYKRQYNDTTPFFEQMIKSGLDLH 420</p> <p>421 ILVYNGDIDAFCNFLGAERFASRLATKFSLDKQTRQEWTFAEKPKYKPSIAGYHORYTTK 480</p> <p>481 KGKVIFDFLSVKGSGHFVQLDRPGPALQMLENYIANKNYSSPTTVNTVLKPLLPQYQQ 538</p>
AT-24	<p>1 MRVASHHLEFVVIYPLFVVFVNSNGDKAADRIRNLPGLTFDGPFRQYSGFLGTEAGNYLH 60</p> <p>61 YWFVESQNDSSKDPLVLWLNGGPGCSSVGGFLTELGPFRVNSDGITLFENVYSWNKVANV 120</p> <p>121 LFLESPRD 128</p>

Las familias de proteínas a la cual pertenecen estos alérgenos se resumen en la tabla

10.

Tabla 10. Familia de proteínas de los alergenios predichos

En la tabla se resumen los alergenios predichos identificándose la respectiva familia de alergenio así como el correspondiente código en la base de datos *AllFam*.

Alergeno predicho	Identificación	Familia de alergenio	Código <i>AllFam</i> de la familia
AT-1	Disulfisomerasa (abb')	Tioeredoxina	AF023
AT-13	Disulfisomerasa (abb'a')		
AT-19	Disulfisomerasa (aa'b)		
AT-3	Serpina clásica	Inhibidor de serin proteasa, serpina	AF018
AT-4	Esmapina (TIL)	Inhibidor tipo tripsina con dominio rico en cisteínas	AF027
AT-7	Inhibidor de tripsina con dominio doble rico en cisteína (TIL)		
AT-2	Calmodulina	Mano EF	AF007
AT-7			
AT-9	Catepsina B	Cistein proteasa	AF030
AT-11	Catepsina L		
AT-12	Catepsina Z		
AT-14	Catepsina D	Aspartil proteasa	AF004
AT-20			
AT-23	Serin carboxipeptidasa	Carboxilesterasa	AF140
AT-24			
AT-10	Proteínas secretoras ricas en cisteínas (SCP)	CRISP/PR-1/Familia de alergenios del grupo 5 de veneno	AF044
AT-16			
AT-5	Fosfatasa ácida	Fosfatasa ácida histidina	AF062
AT-8			
AT-6	Proteína de choque térmico 70	Proteína de choque térmico 70	AF002
AT-18	Proteína de choque térmico 90	Proteína de choque térmico 90	AF042
AT-21	Proteína D7*	Proteínas de unión a feromonas y odorantes	AF098
AT-22			
AT-15	Poliproteína alérgica de nematodos	Poliproteína de nematodo ABA-1	AF208

2. Búsqueda de alergenios de *A. simplex* s.l. mediante análisis proteómico

2.1 Evaluación de los patrones de inmunorreconocimiento de los productos de ES de *A. simplex* s.l., por parte de pacientes con patologías alérgicas relacionadas con la infección por *A. simplex* s.l.

Los perfiles de respuesta IgE anti-*Anisakis* fueron claramente diferentes en todos los grupos sindrómicos de los enfermos analizados (Figura 12). Algunas proteínas fueron reconocidas por varios grupos mientras que otras mostraron un reconocimiento único asociado a un síndrome.

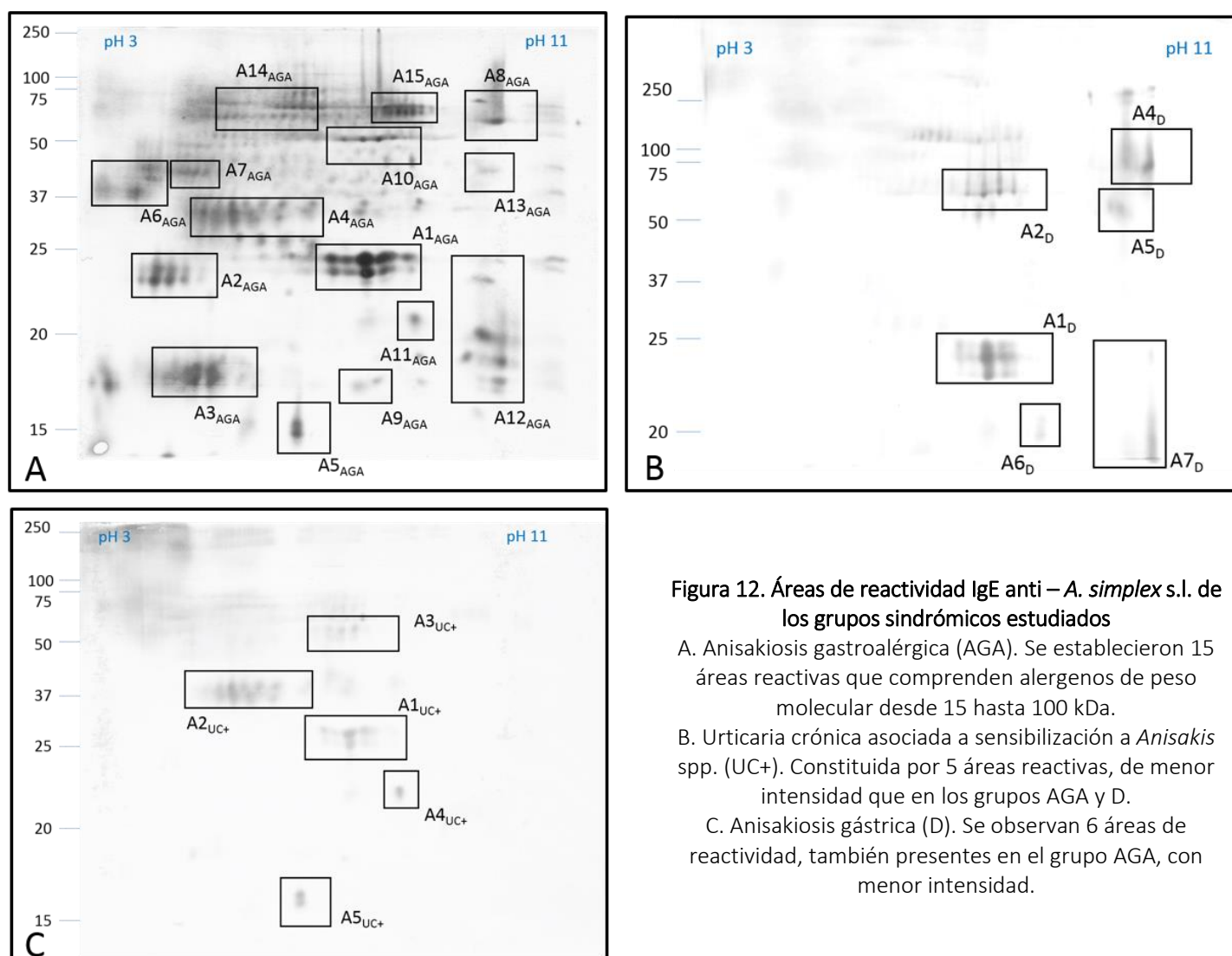


Figura 12. Áreas de reactividad IgE anti – *A. simplex* s.l. de los grupos sindrómicos estudiados

A. Anisakiosis gastroalérgica (AGA). Se establecieron 15 áreas reactivas que comprenden alérgenos de peso molecular desde 15 hasta 100 kDa.

B. Urticaria crónica asociada a sensibilización a *Anisakis* spp. (UC+). Constituida por 5 áreas reactivas, de menor intensidad que en los grupos AGA y D.

C. Anisakiosis gástrica (D). Se observan 6 áreas de reactividad, también presentes en el grupo AGA, con menor intensidad.

Los pacientes aquejados de AGA mostraron el patrón de inmunorreconocimiento claramente más intenso, tanto cualitativa como cuantitativamente, de todos los grupos estudiados. La reacción fue muy potente reconociéndose proteínas alergénicas que abarcaban un amplio rango de Pm, desde 15 kDa hasta 100 kDa y con diferentes puntos isoeléctricos (pH de 4 a 8). Se observaron varias zonas muy reactivas que englobaban diferentes conjuntos de alergen. Así observamos unas áreas muy reactivas con alergen con pesos moleculares intermedios: de entre 15 y 25 kDa (A1_{AGA}, A2_{AGA}, A3_{AGA}, A4_{AGA}, A11_{AGA}, A12_{AGA}); de peso molecular medio-alto: por encima de 37-75 kDa (A6_{AGA}, A8_{AGA}, A10_{AGA}, A13_{AGA}); y dos zonas de peso molecular bajo: por debajo de 15 kDa (A5_{AGA} y A9_{AGA}) (figura 12-A).

Los patrones de reconocimiento de los pacientes aquejados de UC+ (figura 12-C) fueron mucho menos reactivos que los de los grupos de AGA y D. Se identificaron 5 áreas de baja reactividad [A1_{UC+}= A1_{AGA}= A1_D], [A2_{UC+}= A4_{AGA}], [A3_{UC+}= A10_{AGA}= A2_D], [A4_{UC+}= A11_{AGA}=A6_D], [A5_{UC+}= A5_{AGA}].

Como era de esperar, el patrón de inmunorreconocimiento de los sueros de los pacientes con sospecha de D (anisakiosis gástrica), con manifestaciones digestivas pero que no presentaron manifestaciones alérgicas (figura 12-B), fue mucho menos reactivo que el observado para el grupo de AGA (figura 12-A). En general en el grupo de D no se detectaron proteínas ácidas (pI < 6) y las áreas reactivas mostraron patrones similares a los de AGA aunque con mucha menos reactividad [A1_D= A1_{AGA}], [A2_D= A10_{AGA}], [A4_D= A8_{AGA}], [A5_D= A13_{AGA}], [A6_D= A12_{AGA}].

En el caso de los pacientes con SBC, la reactividad fue tan baja (no se muestra la imagen) que no se pudo garantizar la identificación de los pocos *spots* reactivos.

2.2. Selección de *spots* de los diferentes grupos e identificación de los alergen correspondientes

En las figuras 13-A, B y C se muestran los *spots* seleccionados (círculos en rojo) para su posterior digestión trípica e identificación de los péptidos correspondientes mediante MALDI-TOF. De cada área de alta reactividad (rectángulos en negro) se seleccionó un *spot* (círculos en rojo) para su estudio, a excepción del área 7 y 14 que, aunque fueron muy reactivas mediante *western blotting* no se identificaban bien en el gel en 2D.

Los péptidos obtenidos tras la digestión trípica fueron identificados por comparación con las proteínas putativas (CUFF) presentes en la base de datos MH-E2. Los resultados se muestran en la tabla 11. De manera similar, los péptidos obtenidos tras la digestión trípica fueron identificados mediante comparación, esta vez, con las proteínas presentes en la base de datos NCBI. Los resultados se muestran en la tabla 12.

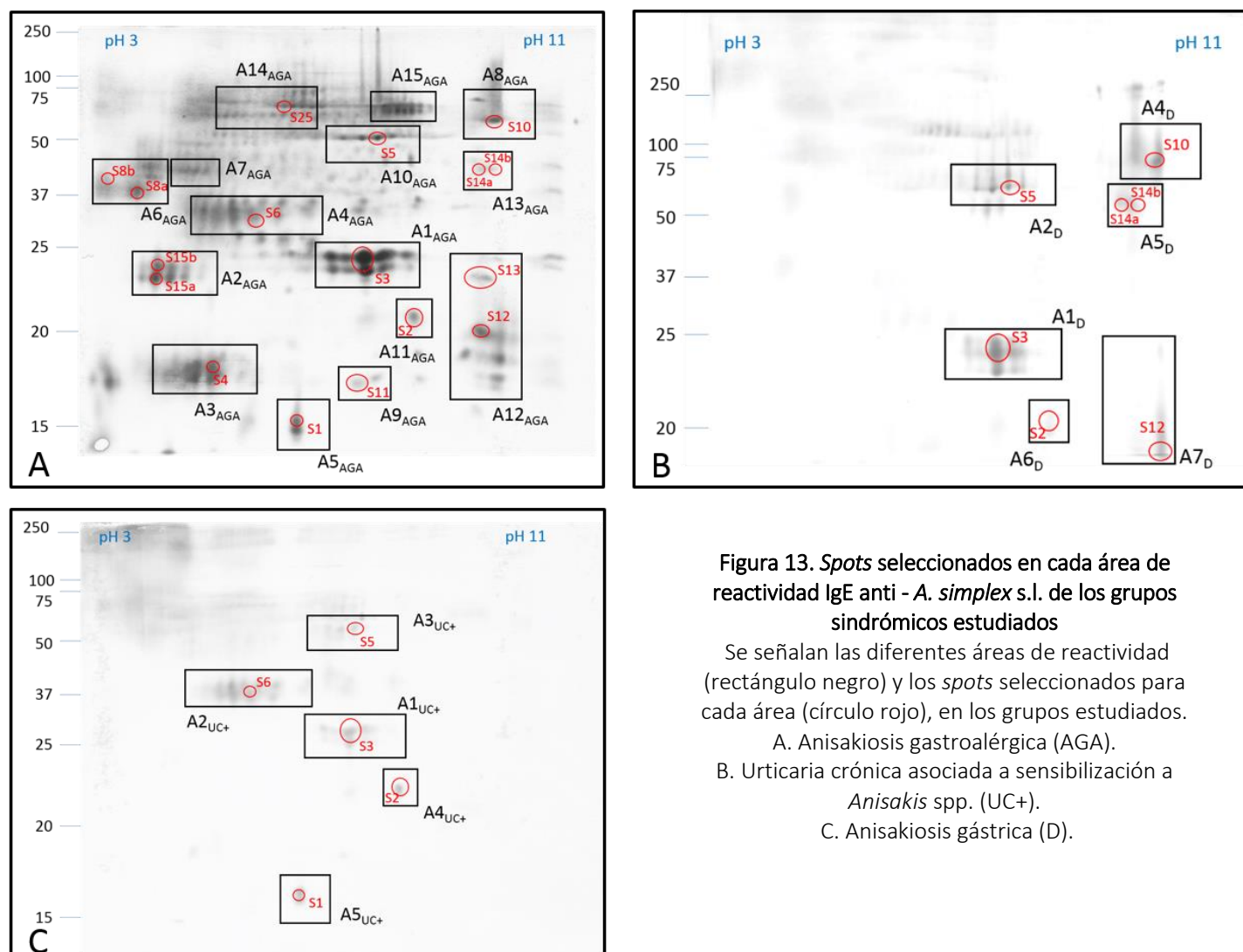


Figura 13. Spots seleccionados en cada área de reactividad IgE anti - *A. simplex* s.l. de los grupos sindrómicos estudiados

Se señalan las diferentes áreas de reactividad (rectángulo negro) y los spots seleccionados para cada área (círculo rojo), en los grupos estudiados.

A. Anisakiosis gastroalérgica (AGA).

B. Urticaria crónica asociada a sensibilización a *Anisakis* spp. (UC+).

C. Anisakiosis gástrica (D).

Tabla 11. Proteínas identificadas mediante *matching* de péptidos a partir de la base de datos MH-E2, mediante el algoritmo MASCOT

Se resumen los péptidos resultantes tras la digestión de las proteínas seleccionadas en cada área, identificadas con la base de datos MH-E2. ¹: número de identificación en la base de datos MH-E2. ²: número de péptidos buscados (número de péptidos *matched*). ³: secuencia de los péptidos *matched*. ⁴: puntuación asociada a cada búsqueda.

Área	Spots	Alergeno	Proteína identificada	CUFF ¹	Nº péptidos <i>matched</i> ²	Péptidos <i>matched</i> ³	Score ⁴
A1 _{AGA}	3	ATP-1	Superfamilia SCP Antígeno 5 venom	6734.1	25 (6)	K.QVNVVCEYR.N R.CVFQHSPEFR.H R.NQGNFWSAPIYK.I K.YGVTASEAWWSELKR.V K.WDCDLEKQSQEWVNR.C K.QVNVVCEYRNQGNFWSAPIYK.I	749
A2 _{AGA}	15a	ATP-2	Sin función definida. Exclusiva nematodos	7193.1	22 (5)	R.LAFCSER.K R.EADYCLR.K K.AILSTPPDEQR.C R.ATCDCVEETRTDLK.K K.NKPAGQSLGMDSLNNGVGR.K + Oxidación (M)	417
	15b	ATP-3	Superfamilia SCP	7848.1	11 (3)	K.ALEMNDKVR.E K.ALEMNDKVR.E + Oxidación (M) R.EFIDQHNQLR.S	186
A3 _{AGA}	4A	ATP-4	Alergeno 24 kDa. Común a todos los nematodos	6780.1	23 (7)	R.DCVLEYRPR.I R.SGVSALAECP.R.L R.FAAEAGANYQMLR.D R.FAAEAGANYQMLR.D + Oxidación (M) R.FAHCMQECVER.Q R.DTCSAVPTDFQVPK.R K.NCAIQNQLLTTPVIQSLCECAVR.S	668
A5 _{AGA}	1	Ani s 4	Ani s 4 (CAK50389.1)	5725.1	11 (3)	K.KWENFEEVK.V K.ISAMINDGKPHLVK.V K.ISAMINDGKPHLVK.V + Oxidación (M)	231
A6 _{AGA}	8a	ATP-5	Colágeno 40 de cutícula	10587.1	4 (1)	K.GSCDHCPPPR.T	74
	8b	ATP-6	Aspartil proteasa	14020.1	9 (3)	K.LFAFYLSR.D R.DGTTINGGELTLCGIDESR.Y R.TNEQFHIQYSGSSSGHIDR.D	476

A8_{AGA}	10	ATP-7	Glutamato carboxipeptidasa	8781.1	23	R.HLGSESLDR.A K.IVEEHGGVGVLVK.S R.VAFWTAEEQGLLGAR.Y K.SITPFSPALPHTGSGAR.G K.DGFDNVHTEEVDPK.W	581
A9_{AGA}	11	ATP-8	Colágeno	3355.1	4 (1)	K.GPAGPPGPPGPPGPPGAPGLAGAPGEK.G	191
A10_{AGA}	5A	ATP-9	Esterasa intestinal	4898.1	38 (5)	R.SAYYGQNAQK.V R.QHIDKFGGDANR.L R.ADVFLGVPIYAQPPVGALR.F K.SVQQMVDFDKTVFEWK.M K.SVQQMVDFDKTVFEWK.M	624
A11_{AGA}	2	Ani s 1 (Q7Z1K3.1)	Ani s 1	2622.2	22 (2)	K.YTGCGGNANR.F K.SCDDQFCPEDAK.C	251
A12_{AGA}	12	ATP-10	Metilmalonil-CoA epimerasa	12588.1	8 (2)	R.LNHVAIITPDMEK.S + Oxidación (M) R.LNHVAIITPDMEKSR.K + Oxidación (M)	166
	13	ATP-11	Proteína con dominio ML	4118.1	10 (4)	K.ILDQYPK.V R.DVDKLQTTVR.A K.LGGALVPFNLDNDNPCEK.G K.SNFELISVEAAGCPGTGNSCDFK.R	288
A13_{AGA}	14a	ATP-12	Ani s 12 <i>like</i> Ani s 7 <i>like</i>	7616.1	5 (2)	K.FTTCLLR.G R.AIKEPELFNAK.F	102

Tabla 12. Proteínas identificadas mediante *matching* de péptidos a partir de la base de datos NCBI, mediante el algoritmo MASCOT

Se resumen los péptidos resultantes tras la digestión de las proteínas seleccionada en cada área, identificadas con las bases de datos públicas de NCBI. ¹: número de acceso de la proteína a las bases de datos NCBI. ²: número de péptidos buscados (número de péptidos *matched*). ³: secuencia de los péptidos *matched*. ⁴: puntuación asociada a cada búsqueda.

Área	Spots	Alergeno	Proteína identificada	Acceso ¹	Nº péptidos <i>matched</i> ²	Péptidos <i>matched</i> ³	Score ⁴
A5 _{AGA}	1	Ani s 4	Ani s 4 (CAK50389.1)	gi 110346534	12 (3)	K.KWENFEEVK.V K.ISAMINDGKPHLVK.V K.ISAMINDGKPHLVK.V + Oxidación (M)	263
A6 _{AGA}	8	ATP-4	Colágeno de cutícula	gi 308494967	5 (1)	K.GSCDHCPPPR.T	92
A8 _{AGA}	10	ATP-7	Glutamato carboxipeptidasa	gi 541043682	4 (1)	R.VAFWTAEEQGLIGAR.Y	164
A11 _{AGA}	2	Ani s 1	Ani s 1 (Q7Z1K3.1)	gi 442577857	22 (2)	K.YTGCGGNANR.F K.SCDDQFCPEDAK.C	268
A12 _{AGA}	12	ATP-10	Metilmalonil-CoA epimerasa	gi 734547582	2 (1)	K.AVPEWGVQTAFVLPNTK.I	112
A13 _{AGA}	14b	As22U	As22U	gi 342359990	8 (3)	R.NSHIDFNTMR.T + Oxidación (M) R.QQCCEVRPCKDK.A K.ANDCGLALPQETVIK.T	102
A14 _{AGA}	25	ATP-13	Neprilisina	gi 734549485	10 (1)	R.LTQGENIADNGGIKEAYK.A	127

A pesar de que los *spots* que conforman las áreas A7_{AGA} y A15_{AGA} resultaron ser inmunorreactivas, no fue posible la identificación peptídica.

En la tabla 13 se muestra la identificación de cada alérgeno y su correspondiente reconocimiento según la patología alérgica.

Tabla 13. Relación entre alérgenos identificados experimentalmente y áreas de reconocimiento específicas
Se resumen las proteínas correspondientes a los *spots* obtenidos en cada área de reconocimiento en las diferentes patologías estudiadas asociadas a *Anisakis* (UC+: urticaria crónica asociada a sensibilización a *Anisakis* spp.; D: anisakiasis digestiva; AGA: anisakiasis gastroalérgica).

Área de reconocimiento			Spot	Alérgeno	Identificación
UC+	D	AGA			
A1	A1	A1	3	ATP-1	Superfamilia SCP Antígeno 5 venom
A3	A2	A10	5	ATP-9	Esterasa intestinal
A4	A6	A11	2	Ani s 1	Ani s 1
-	A4	A8	10	ATP-7	Glutamato carboxipeptidasa
-	A5	A13	14a	ATP-12	Alérgeno similar a Ani s 12 y Ani s 7
			14b	As22U	Alérgeno similar a As22U
-	A7	A12	12	ATP-10	Metilmalonil-CoA epimerasa
A5	-	A5	1	Ani s 4	Ani s 4
-	-	A12	13	ATP-11	Proteína con dominio ML
-	-	A3	4	ATP-4	Alérgeno de 24 kDa
-	-	A2	15a	ATP-2	Sin función definida. Exclusiva de nematodos
			15b	ATP-3	Superfamilia SCP
-	-	A6	8A	ATP-5	Colágeno 40 de cutícula
			8B	ATP-6	Aspartil proteasa
-	-	A9	11	ATP-8	Colágeno
-	-	A14	25	ATP-13	Neprilisina

En la tabla 14 se muestran los pesos moleculares (pm), número de nucleótidos (nt), número de aminoácidos (aa), y el pI teórico de los alérgenos identificados a partir de las proteínas putativas (CUFF) incluidas en la base de datos MH-E2; mientras que en la tabla 15, se incluyen las secuencias de los alérgenos.

Tabla 14. Características de los alérgenos de *A. simplex* s.l. identificados experimentalmente

En la tabla se incluyen las diferentes áreas de reactividad, los *spots* identificado por área, nombre de la proteína (alérgeno) y la identificación asignada, con sus respectivas características en cuanto a peso molecular (pm) expresado en kDa, número de nucleótidos (nt) y aminoácidos (aa) que la conforman, punto isoeléctrico (pi) y el número de acceso al CUFF correspondiente.

Área	Spot	Alérgeno	Proteína identificada	Pm	nt	aa	pi	CUFF
A1 _{AGA}	3	ATP-1	Superfamilia SCP Antígeno 5 venom	25,5 23,5	696 644	232 214	7,1 6,2	6734.1
A2 _{AGA}	15	ATP-2	Sin función definida. Exclusiva de nematodos	40,1 39,05	1.116 1.065	372 355	8,7 8,7	7193.1
	15	ATP-3	Superfamilia SCP	23,7 21,9	636 585	211 194	4,80 4,70	7848.1
A3 _{AGA}	4	ATP-4	Alérgeno 24 kDa	23,5 21,5	639 582	213 194	5,28 5,28	6780.1
A5 _{AGA}	1	Ani s 4	Ani s 4	12,7 10,3	348 282	116 94	5,56 5,54	5725.1
A6 _{AGA}	8	ATP-5	Colágeno 40 de cutícula	30,4	903	301	5,01	10587.1
	8	ATP-6	Aspartil proteasa	43,9 41,5	1.191 1.131	397 377	4,52 4,52	14020.1
A8 _{AGA}	10	ATP-7	Glutamato carboxipeptidasa	48,4	1.296	432	6,57	8781.1
A9 _{AGA}	11	ATP-8	Colágeno	7,6	246	82	6,28	3355.1
A10 _{AGA}	5	ATP-9	Esterasa intestinal	60,7 58,6	1.629 1.572	543 524	6,18 6,19	4898.1
A11 _{AGA}	2	Ani s 1	Ani s 1	21,2 18,8	585 516	195 172	6,52 6,86	2622.2
A12 _{AGA}	12	ATP-10	Metilmalonil-CoA epimerasa	18,4 16,3	507 447	168 148	6,30 6,29	12588.1
	13	ATP-11	Proteína con dominio ML	18,3 15,8	498 432	166 144	8,39 8,24	4118.1
A13 _{AGA}	14	ATP-12	Ani s 12 <i>like</i> Ani s 7- <i>like</i>	19,6 17,7	534 483	178 161	8,26 8,32	7616.1
	14	As22U	As22U	23,5 21,6	636 585	212 195	9,06 9,03	2670.1
A14 _{AGA}	25	ATP-13	Neprilisina	83,5 80,5	2.208 2.208	732 706	5,3	13080.1 13159.1 14479.1

Tabla 15. Secuencias aminoacídicas de los alérgenos de *A. simplex* s.l. identificados experimentalmente

Se muestran las secuencias en aa de los alérgenos identificados, en las que se resalta la secuencia correspondiente al péptido señal (negrita) en las proteínas que lo presentan. Así mismo, se identifican los sitios de N-glicosilación (*sequon*: Asn-Xaa-Ser/Thr): en rojo la asparagina involucrada en posible N-glicosilación mientras que el resto de los aa de la secuencia consenso en azul.

Área	Alérgeno	Secuencia (aa)
A1 _{AGA}	ATP-1	1 MSALFALLGFLPLIVTA QWDCPNSLLTPAAKQAIIVAKHNELRETIVHGKALRKGDVPIPK 60 61 AANMYAMKWDCDLEKQSQEWVNRVCFQHSPEFRHAGENIFASSTTGS LGDLGKYGV TAS 120 121 EAWWSELKRVTDMDIKIENNEVPFGGP IFGVAGHWQMAWGETTKVGC GQI Q N C TRGTSGW 180 181 KQVNVVCEYRNQGNFWSAPIYKIGDGHQDSDCTSFQGSKCDTSTNLCLSP. 231
A2 _{AGA}	ATP-2	1 MNTLLLVLA VGVSLVNS QECSSPAGTKKAFGKYLTCTIKRMLDDDYGVYEEEIREHNRKAA 60 61 AACFAPTIAAANTKERCVLATSDLEQKAWDRNGPLRDCSICRKFAAGAIKAILSTPPDEQ 120 121 RCIRNEVTKAVAREADYCLRKIPDFAGVPEIPDLEEGSYEYKENVISSVSDYILVHSRL 180 181 AFCSEKPARAAATRKCLKNPFVGYMAKHCEVLHKCTELVSAGCTAKIKQTKRATCDCVE 240 241 ETRTDLKKRISSIAGAIKSAVEGNARGAPAI GSGSKVDTCVANIKTHMITPVNDWVTVID 300 301 SALGACIKNKPAQQLGMDSLN VGC RKVIADTTGTAATQLKAGDFDINNLI DAMVDRSG 360 361 RFCGGPSCVEY. 371
	ATP-3	1 MLAAIVLLGFLPLIVNA QEKCKALEMNDKVREFITDQHNQLRSKFALNGYESKPAKNMY 60 61 QLKYDCQLENEAQKLALTCDLLQSLNGVNYFLT AGPDADNTEPEHIFKNLLNSWISYIED 120 121 NEYTFSLTTYQGNPNFPQMVGWSTTRLGCALNT N C T YYEMHADSVVCRYEQPGNVPEGEVI 180 181 YEAGDPCKQDSDCTTYPGSKCLADKGLCVKP 211
A3 _{AGA}	ATP-4	1 MLQLYGILLVGLAVSGGWA QQMQRMCTCDEARPCKESIFQTIQPCADK CERFAAEAGANY 60 61 QMLRDCVLEYRPRIVETVRCSVDQLRDTCSAVPTDFQVPKRYPIGIELAFVEEIGSMLTT 120 121 AGVSDQITQFVALGRRFAHMQECVERQTNKCAF DNVCALNLPPDNQLVAIVKNCAIQNQ 180 181 LLTTPVITQSLCECAVRSGVSALAE LCPRLIIQ. 212
A5 _{AGA}	Ani s 4	1 MQSRIVVAVVVFC CI I LMQTEA GMLGGSSD VDVNDPEIKELAGKSI AKISAMINDGKPHE 60 61 LVKVVS AKKQV VAGDKY TLEILVKDGDH QDLCTVTI WQKKWENFE EVVKLKD HQ. 115
A6 _{AGA}	ATP-5	1 MCARIWILNEEPKMESEDPKQCLVEAEGMKRLAFCGVA VSTVATLVAIVCV PMLCTYMQN 60 61 VQSNLQDEISFCRTRSVSLRGEYTKLAHSRQAVKAEREKRQVTHECCSCGIGPSGAPGAP 120 121 GPDGEDGRDGKAGKPGPNPDAEEGQKPT EKDWCFNCPEGPAGPAGQAGPKGPQGTAGDK 180 181 GEDGPAGPPGPTGPLGPVGP KPGVGEAGAEAGEAGKPGVQHEVP GP PGP PGP PGP PGP PGP 240 241 AGPEGRDGRPGRKGRGPAGENGKDAENGQD GALDQGEAGADGPKGSCDHCPPRTAPG 300 301 Y 301
	ATP-6	1 MAKAVEYLLVVLALSCTSEA IIRVPIMKR N C T KGIKSSEYNTKQLANFLVKYGVLD AFS 60 61 TGQSAEPFSELLADLGN DQYIGPITIGTPPQKFIVLFD TGSSNLWVPCADCSRFDRA CQN 120 121 HNQFTCSLSQTCRRTNEQFHIQYGS GSSSGHIDRDI VCFNSPNSGYCTDANQGFA CVTSE 180 181 PGNTFTNAAFDGI LGMAWDSIAQDHIAQPM DQIFERPECAQKLFAFYLSRDGTTINGGEL 240 241 TLCGIDESRYTGQLSWHPLISETYWMIGMDAVY LGSQQLAGQYKGVLDGTSLMLVPNEQ 300 301 FSMIMQFLDVEEYNGQFIMDCSTVNTFPPLI FFLDDQKFEVPP EAYIVEVDDGQCIVTLQ 360 361 PGDIDFWILGDI FIGQYYTVFDHANKRIGLAQAART. 396
A8 _{AGA}	ATP-7	1 VLSLFVVS KY N R S SHELINYFVKGKTGLAYEWLSTLV DKFGRHLGSESLDRAIDYVVK 60 61 GLKKDGF DNVHTEEVPDL PKWVRGDDLVQM IKPRLQKFNALIDGCPPA N I T AEAVVVKH 120 121 YDELKH I N V T GKIVVFDQWKGYGKT VKYRRSAKIVEEHGGVGVLVKSITPFPSPALPHTG 180 181 SGARGSKI PALTITL EADMLYRMQKRGEKII INLDIKSHPDG N V S SRNILEIKGSEMP 240 241 SEVVLLSGHMDTWDVQGALDDGGGCAVMWSVLYAL KQLSKRNSIFAPKRTIRVAFWTAE 300 301 EQGLLGARYYYETHKNDTNEHFV FVSESDQGA FKPNWFSSIEFAGNKAQTKQMD EIVEI 360 361 LNDYGIPLSVLPNDRQGD IQPWTDEGIPSVNYLPDQGRSYYFYQHHTDADYMSIFKREGDL 420 421 EYTGAIFGVIAH 432
A9 _{AGA}	ATP-8	1 PCEPVT PPPCKPCPPGPPGADGPPGPPGPKGPAGPPGPPGPPGPPGPPGAPGLAGAPGEK 60 61 GICPKYCAIDGGVFFEDGTTR 81

A10 _{AGA}	ATP-9	1 MARIELLLAVIAFINQCFA ETSVAVTTSIGQVTGYVANFGDDTAQLYHGRADVFLGVPYA 60 61 QPPVGAALRFKKPQPIANLQGVYNSQPKVCPQLRKKADEMSEDCCLKNIFSPNVSATVKYP 120 121 VMLWIHGGSFMSGASDYNVDGVVSNFVSHDVVVVIQYRLGALGFFTTQSDEFFANLGM 180 181 LDQVEAIKFVRQHIDKFGGDANRLTVFGFSAASAHTYSPLSQSLFQQAIVHSNPIMTSLD 240 241 GYFGRDKVSEKFAKAICDIDFPAKGEKLTCLDQCLAQKSVQQMVDFDKTVFEWKMSIDNY 300 301 FLTGMPNETFQQRPNIPVIMGNCKDEWSFVDFKMARGMATLNSYDKTSVEKTLERSAY 360 361 YGQNAQKVMFEFVVGKYPKPEGTDDNDHLAWLKIKSNVLTAAAGFTSVMALDASYIIONQNP 420 421 VFMYEFDYSSAVGRKYEVPGWKVPVHYAEIPLLWKQNSAWTKAKAGVVPADYEYANHLGE 480 481 MWTTFAKTGFKCDRTENCVPVWTAVPVGGQDKMPYNSIDQQQSMQADFRQKDREVFLEKVPN 540 541 LL. 542
A11 _{AGA}	Ani s 1	1 MASMQHFSLAALLLAASICLGDA DRTECQLPLDKGTPCTQEGGVKPSVAWWHDDKSGICL 60 61 SFKYTGCGGNANRPTTIKNCQHQCKMPDRGACALGKKPAEDSNGEQLVCAGMREDCPN 120 121 YQCKMMAFMGLCCPTKEEELFAREYEGVCKSGKPVKMDRGSGWMMTILGKSCDDQFCPED 180 181 AKCEQGLFANCK. 194
A12 _{AGA}	ATP-10	1 MLGSLPILLVLALVLGKVEN SNYGHHMAAHPLAGLLGRNLHVAIITPDMEKSRKLYLD 60 61 LGAKVTESKAVPEWGVQTAFLVLPNTKIEFVYPYADDSVPKWLDAHKEGGLHHICIEVE 120 121 NIHKAIEEAKKKGIRTKGTEPKIGAHGKLCIFLDPQDTGSVNVELEEK 168
	ATP-11	1 MARISLIQLTFLAAFSLTCCQA EDFRPIRYKDKCKSNFELISVEAAGCPGTGNSCDFKRG 60 61 EPRIRIGFKPNRDVDKLQTTVRAKLGGLVFPNLDNDNPCEKGLTCLPKIGQTYYSQS 120 121 VKILDQYPKVNVQVNWLLNDKSNDESNDKSKREVCIIFLAKVVD. 165
A13 _{AGA}	ATP-12	1 MLFHCVLAWLLVQGALS KTNDVEMTECKSRSGDCDALQEECVAGTGAPPVQIGENNEYK 60 61 MSSALKDCIETGGLMKSCMKHLNNQSRSSSIETGCVEKYGKEDGNRFRPERLSKNVAECFG 120 121 FRSLVAEYHQKVGAKKTRETEKCRQKARAIKEPELFNAKFTTCLLRGLQKSRAESP. 177
	AS22U	1 MIRILEFTFALTAFVCNA QEFKRQCQCSEVRPCKDKAIQSVPEPCADKCGAKEFLRNSHIDF 60 61 NTMRTCIMQYRPQIVQSMQCSIDTFKDACSQGPTNRKVKKLYASSIEIAIMGEINQMITV 120 121 NQISGQVAQYVAIGRKYANCQKCIERRSTECQKANDCGLALPQETVIAKTIKNCVVRSG 180 181 LLTTQVAQTLNCNAVRAGARSLAPVCPTIIQ 212
A14 _{AGA}	ATP-13	1 MDARLLSLLSFLSATPYLLIINISRP MATATPTSIAIGPQIGNTVEVGQSSGYQKAANII 60 61 LSAINQSADPCDNFFEFACGRWLSNQIPEDQSNYGRLYELDAKVESEMKGLYESKETSQ 120 121 SRINEIRQIYAACMDEQRLNQLRGTELVAIQMGYWPVHGGKWHANKYDLTDLLIYA 180 181 GTTRAMQMFLNIYVAEDQRNISRRLIYVDQANLGLDSRDYLDTEYEEQLKAYQYIAN 240 241 KAKLVAEDAGEPIKGKRIAGVEEIIINLETSAKVMVSEDDRRDYSKMYNPYKLSLDLNDL 300 301 FPLVDWNKYFKAVMPDELHEYLNTNPDIVTEVDYLKKVTNLLKTVDARILTNIVWRYT 360 361 SAWSLQLGSRYYDISQDFLRVLIGKEVKSPRWKDCSAAASSRMEDAASAIYAREYFNTKD 420 421 KEAVLDMIKDLHDAFREMVSQNDWMDEQTKKIAIEKSKAMQSLIGYPDFVLSDEKLDHY 480 481 KLLKLEQGDYASMAQKTTKWLQDHWSRKLIEPVDRTFEFSSSTVNAFYAAPKNAIMFP 540 541 AAILQSPLFDRTPFAVNYGSGISGVIGHEITHGFDDQGSQFDKGNLLDWWQDQATKEQFN 600 601 KRTGCIVEQYSKFSPLPGTDVHVNGLLTQGENIADNGGVKEAYKAYKNHVKKSREDEKRLP 660 661 GLEKYTNDQIFFVSFAQSWCGKTKPAAARELILTDPHSPQFRVEGAAVNQPEFAEAFQC 720 721 ASGTAMNPVTKCDVW. 735

2.3. Comparación de los genes de los nuevos alérgenos descritos con los disponibles en las bases de datos públicas para las especies del complejo *A. simplex* s.l.

Las secuencias correspondientes a los nuevos alérgenos se compararon con las descritas por Baird *et al.* (2016), para las especies *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, y las incluidas en la base de datos de secuencia genómica de Sanger (*A. simplex* s.l.). En la tabla 16, se detallan las variaciones aminoácidas observadas en cada alérgeno; observándose que las secuencias de

alergenos obtenidos de la base de datos MH-E1 y MH-E2 presentan mayor similitud con las secuencias de la especie *A. simplex* s.s. (70%) que con *A. pegreffii* (30%) de los casos.

Tabla 16. Variaciones en las secuencias de los nuevos alergenos en las diferentes especies estudiadas de *A. simplex* s.l.

En la tabla, se resaltan en rojo los aminoácidos que coinciden con la secuencia correspondiente en *A. simplex* s.s. mientras que, en verde, en *A. pegreffii*.

Área/Spot	Alergeno	Posición	Base de datos			
			MH-E1 y E2	Baird <i>et al.</i> , 2016		Sanger
				<i>A. simplex s.s</i>	<i>A. pegreffii</i>	
A1 _{AGA} /S3	ATP-1	95	H	H	N	H
		129	R	R	Q	R
		135	I	I	I	I
		145	G	K	K	G
		147	P	A	A	P
		164	T	T	S	T
A2 _{AGA} /S15a	ATP-2	103	T	T	T	K
		207	A	A	V	A
		225	T	T	V	T
A2 _{AGA} /S15b	ATP-3	138	Q	P	Q	Q
		155	N	K	N	N
		158	Y	H	Y	Y
		183	A	V	V	A
		212	A	V	V	A
A3 _{AGA} /S4	ATP-4	21	--	E	E	Q
		23	Q	Q	L	Q
		27	T	T	R	T
		124	S	N	N	S
		143	E	G	G	E
		151	K	R	R	K
		157	V	Q	Q	V
A5 _{AGA} /S1	Ani s 4	20	T	T	A	--
		25 (2)	L	P	L	--
A6 _{AGA} /8 ^a	ATP-5	186	--	T	A	A
		192	--	N	A	T
		198	--	V	M	V
A6 _{AGA} /S8b	ATP-6	21	I	I	L	I
		113	R	R	W	Y*
		116	R	R	W	Q*
		136	N	S	S	N
		156	I	T	T	--
		189	A	G	G	--
		235	I	R	R	--
		268	G	G	E	--
		323	T	T	T	T
A8 _{AGA} /S10	ATP-7	255	M	T	M	M
		340	F	F	F	P
		341	V	V	V	T
		342	S	S	S	Q

A9 _{AGA} /S11	ATP-8	-	-	No reportadas en las bases de datos		
A10 _{AGA} /S5	ATP-9	80 128	A L	A L	T R	A L
A11 _{AGA} /S2	Ani s 1	37	P	P	Q	--
		56	S	S	T	--
		65	T	T	M	--
		77	I	I	S	--
		83	H	H	N	--
A12 _{AGA} /S12	ATP-10	74	L	L	L	I
		83	S	S	S	T
		92	Q	Q	H	N
		101	T	S	T	S
		107	Y	Y	H	Y
		132	I	I	L	I
		139	K	K	R	K
		147	K	K	L	K
		165	C	C	V	C
		171	Q	E	R	Q
		174	G	G	N	G
		175	S	S	G	S
A12 _{AGA} /S13	ATP11	111	I	T	I	--
A13 _{AGA} /S14a	ATP-12	-	No presentan diferencias		No reportadas en estas bases de datos	
A13 _{AGA} /S14A	AS22U	18	I	T	--	--
		125	L	I	--	--
		126	A	A	--	--
		196	S	N	--	--
A14 _{AGA} :S25	ATP-13	448	Q	Q	H	--
		474	K	E	K	--
		479	Y	H	Y	--
		502	A	L	A	--
		504	N	D	D	--
		505	Y	H	Y	--
		507	F	S	F	--
		532	P	A	P	--
		533	P	P	S	--

2.4. Clonación de nuevos alergenicos de *A. simplex* s.l.

2.4.1 Amplificación y clonación de genes correspondientes a los alergenicos identificados mediante *western blotting* bidimensional

Una vez identificados los alergenicos, se seleccionó un alergenico por cada área de reactividad para amplificar y clonar el gen correspondiente. Simultáneamente, la identificación del alergenico ATP-1 (venom VA1) nos llevó a la búsqueda de otros posibles alergenicos de esta familia

de proteínas en la base de datos MH-E2. De esta forma, se encontró una proteína de 230 aa perteneciente a esta familia, en la que identificamos un posible epitopo IgE similar al presente en el alérgeno Ves v 5 (alérgeno principal del veneno de las avispas), postulándose como posible nuevo alérgeno. A esta molécula lo denominamos VA2 en el presente trabajo.

A partir de la secuencia teórica de los alérgenos identificados anteriormente, se realizó la amplificación y clonación de los respectivos genes. En la figura 14, se muestran las amplificaciones de ADN obtenidas para cada gen amplificado.

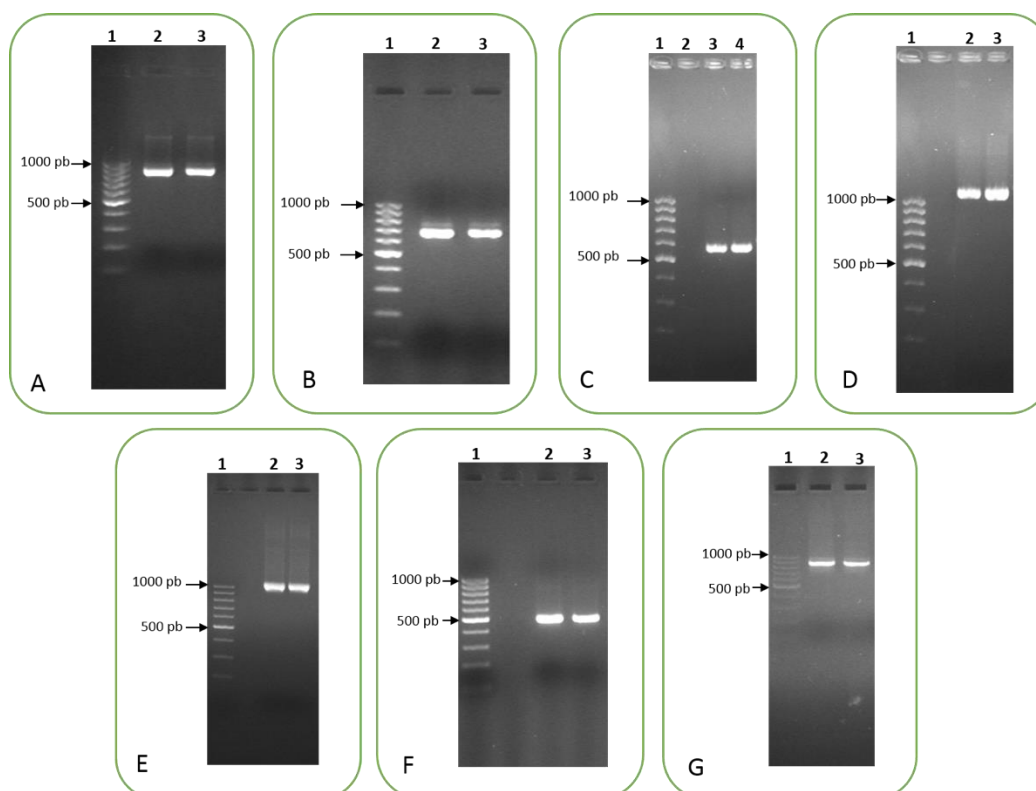


Figura 14. Amplificación de los genes de nuevos alérgenos seleccionados mediante *western blotting* bidimensional

A: alérgeno ATP-1 (Venom VA1). Carril 1: marcador de peso molecular 100pb (Biotools). Carril 2-3: producto de amplificación con un tamaño cercano a 700 pb. B: posible alérgeno Venom VA2. Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb (Biotools). Carril 2-3: producto de amplificación de 691 pb. C: alérgeno ATP-4 (alérgeno 24 kDa). Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb (Biotools). Carril 2-3: producto de amplificación de 576 pb.

D: alérgeno ATP-6 (Aspartil proteasa). Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb (Biotools). Carril 2-3: producto amplificado de 1.131 pb. E: alérgeno ATP-7 (Glutamato carboxipeptidasa). Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb (Biotools). Carril 2-3: producto de amplificación de 1.053 pb. F: alérgeno ATP-12 (Ani s 7 - like). Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb (Biotools). Carril 2-3: producto de amplificación de 495 pb. G: alérgeno ATP-13 (Nepilisin). Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb (Biotools). Carril 2-3: producto de amplificación de 864 pb.

Después, se realizó la clonación en el vector de mantenimiento (*pGEM®-T Easy*; Promega) de cada amplificado indicado. Los recombinantes positivos se secuenciaron confirmando la presencia del fragmento de interés. En la figura 15, se muestran los clones positivos obtenidos para cada alérgeno.

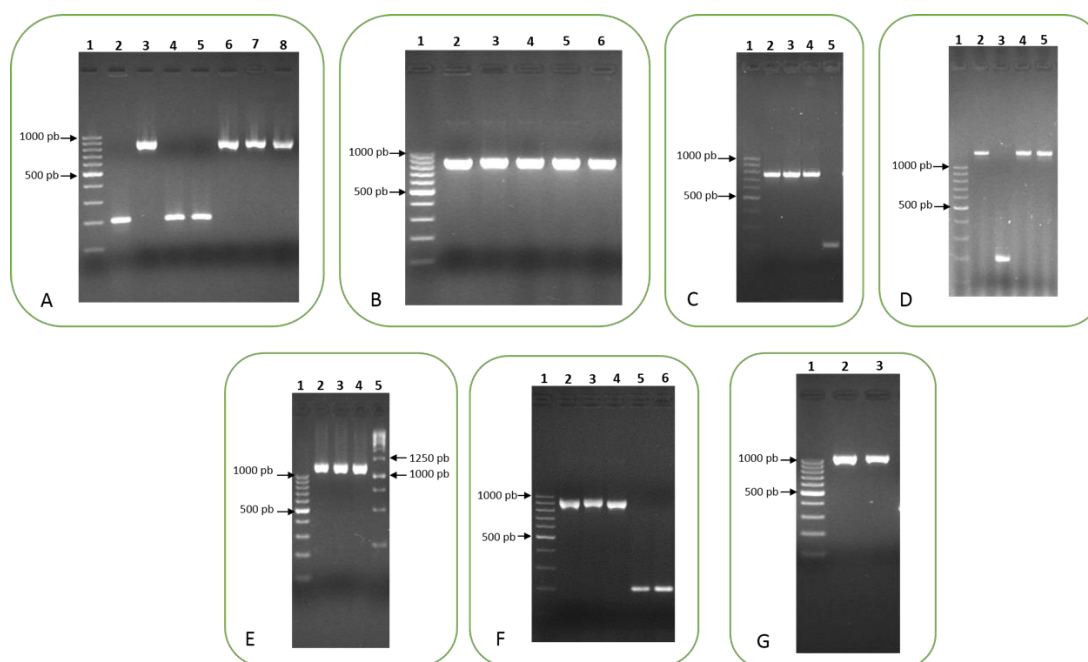


Figura 15. Clones positivos obtenidos a través de PCR de colonias

A: alérgeno ATP-1 (Venom VA1). Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb (Biotools). Carriles 3, 6, 7, 8: clones positivos conteniendo el fragmento de interés. Carriles 2, 4, 5: clones negativos. B: posible alérgeno Venom VA2. Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb (Biotools). Carriles 2-6: clones positivos conteniendo el fragmento de interés VA2. C: alérgeno ATP-4 (alérgeno 24 kDa). Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb (Biotools). Carriles 2-4: clones positivos conteniendo el fragmento de 576 nt. Carril 5: clon negativo. D: alérgeno ATP-6 (Aspartil proteasa). Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb (Biotools). Carriles 2, 4, 5: clones positivos conteniendo el fragmento de interés. Carril 3: clon negativo. E: alérgeno ATP-7 (Glutamato carboxipeptidasa). Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb (Biotools). Carriles 2-4: clones positivos conteniendo el fragmento de interés. Carril 5: marcador de peso molecular 1 kb (Biotools). F: alérgeno ATP-12 (*Ani s 7 - like*). Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb (Biotools). Carriles 2-4: clones positivos conteniendo el fragmento de 495 nt. Carriles 5-6: clones negativos. G: alérgeno ATP-13 (Neprilisina). Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb (Biotools). Carriles 2-3: clones positivos conteniendo el fragmento de interés.

En la tabla 17, se resumen las características de los clones obtenidos para cada antígeno, así como la secuencia aminoacídica deducida correspondiente.

Tabla 17. Características y secuencia aminoacídica de los clones recombinantes correspondiente a los alérgenos identificados mediante *western blotting* bidimensional

En la tabla se describe la secuencia aminoacídica de los clones, así como el peso molecular (en kDa), número de nucleótidos, aminoácidos y punto isoeléctrico (pI) teórico del clon correspondiente a cada alérgeno. En las secuencias se señalan el péptido señal (negrita), secuencias correspondientes a epitopos de unión a anticuerpos de tipo IgE (subrayado) y posibles sitios de N-glicosilación (arginina en rojo, resto del *sequon* en azul).

Alergeno	Proteína identificada	Pm (kDa)	nt	aa	pI	Secuencia (aa)
ATP-1	Alergeno venom 1 VA1	25,4	696	232	7,2	1 MSALFALLGLLPLIVTA QWDCPNSLLTPAAKQAIIVAKHNQLRETIVHGKALRKGDVPIPK 60 61 AANMYAMKWDCLEKQSQEWVNRVCFEHSPQSFNAGENIFASSTTGSGLDLGKYGVTS 120 121 EAWWSELKRVTDDMMKIENNEVPFKGAIFGVAGHWTQMAWGETSKVCGCIQ NR GTSGSW 180 181 KQVNVVCEYRNQGNFWSAPIYKIGDGHQDSCTSFQGSKCDTSTNLCLSP. 231
-	Alergeno venom VA2	26,1	691	230	7,1	1 ERSVYRAKNLYKFSWDCALEAKAQEWADRCVYEHSSENDWRNSGENLYQYYSSEQLTIGEE 60 61 SMTKATDYWWKELADYGIIDSSYKYSYAMSPIGHWTQMAWGKTSKLACGVASCPQMNPWG 120 121 TSTIYVVCHYYEPANYPGQIYEFNGGCSQNSDCTLYSGSTCERSTNLCIAPGYTAPEPN 180 181 PRPKPVPFSPSGQRCTSNVMTDTLRKLVAKRHNALRRDVALGKLRNVDT 230
ATP-2	Alergeno 24 kDa	21,2	576	192	5,3	1 MQRMCCTDEARPKESIFQTIQPCADKCFERFAAEAGANYQMLRDCVLEYRPRIVETVRCS 60 61 VDQLRDTCSAVPTDFQVPKRYPIGIELAFVEEIGSMLTTAGVSDQLTQFVALGRRFAHCM 120 121 QECVERQTNKCAFNDVNCALNLPDPNQILVAIVKNCAIQNQLLTTPVIQSLCECAVRSGVSA 180 181 LAELCPRLIIQ. 191
ATP-3	Aspartil proteasa	41,8	1.131	377	4,52	1 IIRVPIMKR NR TKGIKSSEYNTKQLANFLKVYGVLDAFSTGQSAEPFSELLADLGNQY 60 61 IGPITIGTPPQKFIVLFDTGSSNLWVPCADCSRFDRAQNHQFTCSLSQTCRRNEQFH 120 121 IQYSGSGSSGHIDRDIVCFNSPNSGYCTDANQGFCVTSPEGNTFTNAAFDGLGMAWDS 180 181 IAQDHIAQPMQDIFERPECAQKLFAFYLSRDGTTINGGELTLCGIDESRYTGQLSWHPLI 240 241 SETYWMIGMDAVYLGSQLAGQYKGVLDGTGSLMLVPNEQFSMIMQFLDVEEYNGQFIMD 300 301 CSAVNTFPPLIFFLDDQKFVEVPPEAYIVEVDDGQCIVTLQPGDIDFWILGDFIGQYYTV 360 361 FDHANKRIGLAQAART. 376
ATP-4	Glutamato carboxipeptidasa	39,2	1.053	351	6,15	1 VRGDDLQMIKPRLQKFNALAIDGCPPAN NR ITAEAVVVKHYDELKH NR VTGKIVVFDQKWK 60 61 GYGKTVKYRRSAKIVEEHGGVGLVKSITPFSPALPHTGSGARGSKIIPALITILEEADML 120 121 YRMQKRGEKIIINLDIKSHPD NR VSSRNILFEIKGSEMPSEVLLSGHMDTWDVQGQALD 180 181 DGGGCAVMWSVLYALKQLSKRNSVFAPKRTIRVAFWTAEEQGLLGARYYYETHKNDTNEH 240 241 FVFVSESDQGAQKPKNWFSSIEFAGNKAQTKQMDIEIVILNDYGIPLSVLPNDRQGDIP 300 301 WTDEGIPSVNYLPDQGRSYFYQYHHTDADYMSIFKEGDLEYTGAFVGVIAH 351
ATP-5	Ani s 12 – like // Ani s 7 - like	18,1	495	165	8,3	1 GALSKTNDVEMTECKSRSGDCDALQECCVAGTGAPPVQIGENNEYKMSSALKDCIETGG 60 61 LMKSCMKHLNNQSRCSSETGCVKEYGKEDGNRFPERLSKNVAECFGFRSLVAEYHQVKG 120 121 AKKTRETEKCRQKARAIKEPELFNAKFTTCLLRGLQKSRAESP- 164
ATP-6	Neprilisina	32,5	864	288	7,6	1 MDEQTKKIAIEKSKAMQSLIGYPDFVLSDKKLDDYKLLKLEQGDYASMAQKTTKWAQN 60 61 YWFRKLIPEVDRTEFEFSSSTVNAFYAPPKNAIMFPAILQSPFLDRTFPKAVNYGSIGS 120 121 VIGHEITHGFDDQGSQFDKDGNNLLDWDQATKEQFNKRTGCIVEQYSKFSPLPGTDVHVNG 180 181 LLTQGENIADNGGVKEAYKAYKNRVKSRKDEKRLPGLEKYTNDQIFFISFAQSWCGKSK 240 241 PAAARELILTDPHSPQFRVEGAAVNQPEFAEAFQCSGTAMNPVTKC 288

2.4.2. Obtención de las proteínas recombinantes VA1 y VA2

Las secuencias de interés, carentes de péptido señal, se subclonaron en el vector de expresión pQE30 para la posterior expresión y purificación de las proteínas recombinantes VA1 y VA2. El vector pQE30 permite la expresión de proteínas recombinantes unidas a una cola de histidinas en su extremo N-terminal para facilitar su purificación mediante cromatografía de afinidad. En la figura 16, se muestran las secuencias correspondientes al recombinante VA1 mientras que, en la figura 17, se expone la secuencia del recombinante VA2.

1	ATGTCGGCATTATTTGCGCTCCTCGGTCTTCTGCCCTAATCGTGA CTGCA CAATGGGAC	60
61	TGCCCCAACTCACTGCTCACTCCAGCCGCTAAACAAGCGATCGTTGCAAAGCACAACCAA	120
121	CTCCGTGAAACTATTGTTTCATGGAAAGGCGCTGCGAAAGGGTGATGTTCCGATTCCGAAA	180
181	GCAGCCAATATGTATGCAATGAAATGGGATTGCGATTGGGAGAAGCAGTCACAGGAGTGG	240
241	GTTAACCGATGTGTGTTTGAGCATTACCTCAAAGTTTCAGAAATGCTGGAGAAAACATC	300
301	TTTCGCTTCTCAACAACCGGCAGTTTGGGAGATCTAGGTAAATACGGAGTGACCGCGTCA	360
361	GAGGCTTGGTGGTCCGAGTTGAAACGAGTAACAGCATATGATGAAGATTGAGAACAAC	420
421	GAAGTTCGGTTTAAAGGCGCTATTTTCGGAGTTGCTGGTCATTGGACTCAGATGGCATGG	480
481	GGTGAACATCAAAAGTAGGATGCGGTATACAAACTGTACAAGAGGCACAAGTGGCTGG	540
541	AAGCAAGTCAACGTTGTTTGCGAATATCGCAATCAGGGCAATTTTGGTCTGCACCCATT	600
601	TACAAGATTGGTGTATGGTTGCCATCAGGATTCTGACTGCACATCGTTCCAGGGTTCGAAG	660
661	TGTGATACGTCTACCAATCTTTGTTTGTGCGCCGTAA	696

1	<u>MRGSHHHHHH</u> GSQWDCPNSLLTPAAKQAIIVAKHNQLRETIVHGKALRKGDVPIPKAANMY	60
61	AMKWDCLEKQSQEWVNRVFEHSPQSFNAGENIFASSTGSLGDLGKYGVTASEAWWS	120
121	ELKRVTDMMKIENNEVPFKGAI FGVAGHWQMAWGETSKVGCIGQNCNTRGTSWKQVNV	180
181	VCEYRNQGNFWSAPIYKIGDGCQDSDCTSFQGSKCDTSTNLCLSP	226

Figura 16. Secuencia nucleotídica y aminoácídica del gen VA1

En la imagen superior se muestra la secuencia nucleotídica, compuesta por 696 nt, con la secuencia correspondiente al péptido señal en negrita. En la imagen inferior se expone la secuencia aminoácídica sin péptido señal, subclonada en el vector pQE30. Se señala la secuencia correspondiente al vector (subrayado) y a la cola de 6 histidinas (azul).

1	GAACGGAGTGTTTATCGAGCCAAAAATTTGTATAAATTCAGCTGGGACTGTGCCCTGGAG	60
61	GCAAAAGCGCAAGAATGGGCCGACAGATGTGTTTATGAACATTCGAGAATGACTGGCGC	120
121	AACTCCGGAGAGAACCTATATCAATACTATTTCATCAGAACAACCTGACCATCGGTGAAGAA	180
181	TCCATGACAAAGGCAACAGATTACTGGTGGAAGAATTAGCTGACTACGGAATAATCGAT	240
241	TCGAGTTATAAATACAGTTATGCTATGTCCCGATTGGTCACTGGACGCAGATGGCATGG	300
301	GGTAAAACGAGCAAACTAGCATGTGGAGTAGCAAGTTGTCCTCAAATGAATCCTGGTTGG	360
361	ACATCAACCATCTATGTGCTTTGCCATTATTATGAACCAGCTAACTATCCGGGCCAGCAG	420
421	ATATATGAATTCGGCAATGGATGCAGTCAGAATTCAGATTGTACTTTATACAGTGGATCG	480
481	ACTTGTGAACGATCTACCAATCTTTGTATCGCACCAGGATACACCGCACCTGAACCGAAT	540
541	CCACGTCCAAAACCAACCGTTACGCCATCACCATCGGGACAACGATGCACATCGAATGTA	600
601	ATGACTGATACCTTCGTAAACTAGTCGCTAAGAGACATAATGCACTCAGACGCGATGTT	660
661	GCTTTAGGCAAATTCGCAAAATGTGGACACGA	691

1	<u>MRGSHHHHHH</u> GSERSVYRAKNLYKFSWDCALEAKAQEWADRCVYEHSENDWRNSGENLYQ	60
61	YYSSEQLTIGEESMTKATDYWWKELADYGIIDSSYKYSYAMSP IGHWTQMAWGKTS SKLAC	120
121	GVASCPQMNPGWTSTIYVVCHYYEPANYPGQQIYEFNGCSQNSDCTLYSGSTCERSTNL	180
181	CIAPGYTAPEPNRPKPPVTPSPSGQRCTSNVMTDLRKLVAKRHNALRRDVALGKLNRV	240
241	DT	242

Figura 17. Secuencia nucleotídica y aminoácídica del gen VA2

La secuencia nucleotídica sin péptido señal (691 nt) se incluye en la imagen superior, mientras que la imagen inferior corresponde a la secuencia aminoácídica deducida (230 aa). Se señala la secuencia correspondiente al vector (subrayado), la cola de 6 histidinas (azul) y el sitio de unión de epitopo IgE deducido.

Las condiciones de expresión proteica ideales para estos recombinantes se lograron al emplear una concentración 1 mM de IPTG, e incubación de las células durante 4 h a 37°C. Una vez expresada la proteína, los sedimentos se purificaron mediante el protocolo descrito en el punto "13.1 Purificación mediante cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes " de Material y Métodos, tras haberse comprobado la insolubilidad de las proteínas.

Los eluidos obtenidos se sometieron a diálisis progresiva hasta obtener la recombinante en PBS. Durante el proceso de diálisis se observó precipitación de las proteínas; la fracción precipitada se eliminó por centrifugación. En la figura 18, se muestra las alícuotas tomadas durante el desarrollo de la expresión y purificación de la proteína recombinante VA1.

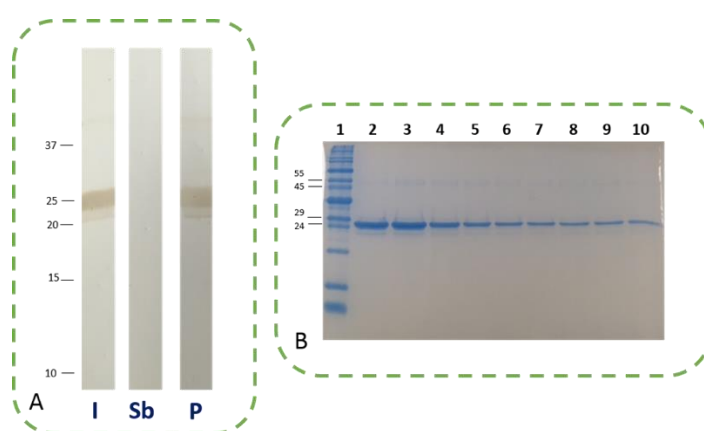


Figura 18. Expresión y purificación de la proteína recombinante VA1

A. Valoración de la expresión y solubilización de VA1 recombinante mediante *western blotting*. Carril I: alícuota tras la inducción durante 4 h. Carril Sb: sobrenadante obtenido tras lisis celular y centrifugación. Carril P: sedimento obtenido tras lisis celular y centrifugación, observándose el recombinante a un tamaño de 23,5 kDa.

B. Gel de poliacrilamida al 15% teñido con azul de Coomassie. Eluidos obtenidos tras la purificación de la proteína recombinante VA1 mediante cromatografía de afinidad con níquel y urea. Carril 1: marcador de peso molecular expresado en kDa (Sigma-Aldrich). Carriles 2-10: proteína obtenida tras elución.

La concentración de la proteína recombinante VA1 fue 122,2 µg/ml, mientras que para VA2 fue de 175 µg/ml. En la figura 19, se muestran los eluidos obtenidos tras la purificación de la proteína recombinante VA2.

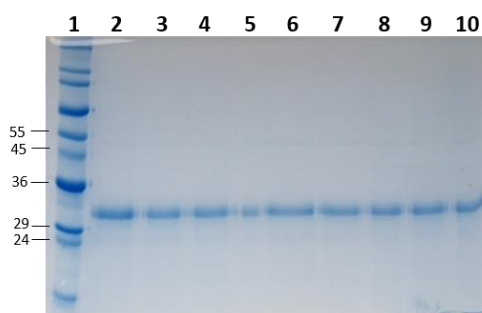


Figura 19. Expresión y purificación de la proteína recombinante VA2

Gel de poliacrilamida al 12,5% teñido con azul de Coomassie. Eluidos obtenidos tras la purificación de la proteína recombinante VA2 mediante cromatografía de afinidad con níquel y urea. Carril 1: marcador de peso molecular expresado en kDa (Sigma-Aldrich). Carriles 2-10: proteína obtenida tras elución.

3. Caracterización molecular de los genes de los alergen^os Ani s 7 y Ani s 14

3.1 Alergeno Ani s 7

La secuencia parcial del alergen^o principal Ani s 7 (ABL77410.1) presenta una estructura conformada por 19 repeticiones de la secuencia CX₁₇₋₂₅CX₉₋₂₂CX₈CX₆, dispuestas en tándem. Rodríguez *et al.*, en el año 2008, clonaron un fragmento (t-Ani s 7) del mismo que abarca de la metionina 435 hasta la arginina 713, para su utilización en diagnóstico. Así mismo comprobaron que dicho fragmento presenta la secuencia correspondiente al epitopo reconocido por el AcM UA3 (MCQCVQKYGTEFCKKRLA) y por los anticuerpos presentes en los sueros de la mayoría de los pacientes con anisakiosis. Por el momento, el gen completo no ha sido descrito, por lo que se procedió a intentar obtener la secuencia completa y llevar a cabo su caracterización molecular mediante herramientas bioinformáticas.

3.1.1 Búsqueda de transcritos relacionados con el alergen^o Ani s 7

Se utilizaron las bases de datos del transcriptoma MH-E1 y MH-E2 de *A. simplex*, generadas en la presente memoria, con el fin de buscar transcritos relacionados con el alergen^o Ani s 7, mediante homología de secuencias. Se encontraron 21 *contigs* con similitud a la secuencia del alergen^o. En la tabla 18, se muestran las características de los *contigs* seleccionados.

Tabla 18. Transcritos con la misma estructura y secuencia que el alergen^o Ani s 7 obtenidos de las bases de datos MH-E1 y MH-E2

En la tabla se resumen los diferentes *contigs* que presentan la misma estructura y secuencia de Ani s 7, su tamaño molecular (en aa), el número de acceso de la secuencia homóloga depositada en la base de datos genómicas de Sanger y en la base de datos MH-E2 (CUFF). *: -113 representa 113 aa del extremo amino que no estaban descrito en Ani s 7 publicado (anteriores a la posición 1).

Nombre contig	Estructura	aa	Posición en Ani s 7	Sanger	Cuff correspondiente
CL4176Contig1	CX ₁₃ CX ₈ CX ₆ CX ₂₂₋₂₄	196	-113-83*	ASIM_0001402501	CUFF.5600.1
CL1Contig2541	CX ₁₃₋₁₉ CX ₈ CX ₆ CX ₂₂₋₂₅	265	87-352		
CL10211Contig1	CX ₁₃₋₁₉ CX ₈ CX ₆ CX ₁₁₋₂₅	263	109-372		
CL1Contig2535	CX ₁₃ CX ₈ CX ₆ CX ₁₁	45	327-372		
CL9795Contig1	Secuencia corta	66	384-450		
CL14284Contig1	CX ₁₁₋₂₂ CX ₈ CX ₆ CX ₂₁₋₂₅	192	802-994		
CL1Contig3790	CX ₉ CX ₈ CX ₆ CX ₂₄	64	1032-1096		
L482T66_91	CX ₁₈ CX ₈ CX ₆ CX ₂₅	119	446-565		
CL1Contig6102	CX ₁₃₋₁₈ CX ₈ CX ₆ CX ₂₁₋₂₅	224	994-1218		
CL679Contig1	CX ₁₃₋₂₀ CX ₈ CX ₆ CX ₂₂₋₂₄	417	995-1412		
L5T6918_40979	CX ₉₋₁₃ CX ₈ CX ₆ CX ₁₇₋₂₅	205	994-1202		
L5T34391_40979	Secuencia corta	22	1198-1219		
L5T34390_40979	Secuencia corta	22	1198-1219		

L5T34388_40979	Secuencia corta	22	1198-1219		
CL1Contig6104	Secuencia corta	22	1198-1219		
L5126T1_4	Secuencia corta	13	1298-1310		
L3664T26_30	Secuencia corta	13	273-285		
CL1Contig2140	Secuencia corta	13	273-285		
CL1Contig2141	Secuencia corta	13	273-285		
CL1Contig2142	Secuencia corta	13	273-285		
L21688T1_1	Secuencia corta	13	95-107		

Los *contigs* obtenidos forman parte de un transcrito de alto peso molecular, identificado mediante MH-E2 como CUFF.5600.1 y conformado por 4,5 kb. Tras el análisis del alineamiento de las secuencias aminoacídicas de CUFF.5600.1 y Anis 7, se obtuvieron 316 aminoácidos más en el extremo amino de la secuencia aminoacídica deducida que no habían sido descritos previamente. En la tabla 19 se muestran las secuencias de los diferentes *contigs* (en aminoácidos).

Tabla 19. Secuencias de transcritos correspondientes a Anis 7 obtenidos de las bases de datos MH-E1 y MH-E2

En la tabla se muestran las secuencias, expresadas en aa, de los *contigs* que presentan la misma estructura y secuencia de Anis 7, obtenidas de la base de datos MH-E1 y MH-E2.

Contigs	Secuencias
CL679Contig1	1 MWHCVQKYGQEFCKNLAATCSTETNTPLPQQDPWRLPQPIIACMLGKMNNPNPTSKPQSVMSQCTARYGDDFCLSLGKAC 80 81 AELNNVPSSMISLSAQQLPQPVSCKMAEMNNPSALWQCIQQYGFCKKLRDACSAMTGASLSTTPWILPQPVSNCMR 160 161 NEMNNPSAMWLCIQKYGIEFCNRLASACAMIKKVTMPTVTINLPEIIASCVASENSQAMCYARKGPEQCKTEENICRNPN 240 241 NPPGSPLTIPETECMKSQVAMATCQKKFGSECVLQEQEAGTGAAPPVTIGARGAFMLATALRSCIFNGGVIGSCVLYHP 320 321 PSQCDQWVQQCATALQTSAGVTVAGGYRQLSPFMAICVASQDLMTRCMTLRLGQTCQAVKNCKRRFNTFSSRLPGRLWS 400 401 LSSELINCLYRPVNRASN 418
CL1Contig2541	1 IGSVLPQVIVDCMTSEMSSPSIMWQCVQKYGTEFCKKLLQDCSASTGASLSPQAPWLIPSVIAECMAKGMVNGGRQADDT 80 81 MAICIQKYGIKFCNIIIGAACSVLTQVPFFPQLPGTVQQLPSELACVRSETQKPNVMTKCEKYGTEFCSSLLQSCSAST 160 161 GAILPLREFPWKIPHPADIADCMYAGMNPESKEDRGGIMSKCIRRYGDFCKKMLESCSALTSVQHDSRNTNYASLPQVLKDC 240 241 MASEMDSPSVMFECVQRYGTFFCKGL 266
CL10211Contig1	1 MWQCVQKYGTEFCKKLLQDCSASTGASLSPQAPWLIPSVIAECMAKGMVNGGRQADDTMAICIQKYGIKFCNIIIGAACSV 80 81 LTQVPFFPQLPGTVQQLPSELACVRSETQKPNVMTKCEKYGTEFCSSLLQSCSASTGAILPLREFPWKIPHPADIADCMY 160 161 GMNPESKEDRGGIMSKCIRRYGDFCKKMLESCSALTSVQHDSRNTNYASLPQVLKDCMASEMDSPSVMFECVQRYGTSTF 240 241 CKGLLETCTEKTRASLSPLCVDTT 264
CL1Contig6102	1 VMWHCVQKYGQEFCKNLAATCSTETNTPLPQQDPWRLPQPIIACMLGKMNNPNPTSKPQSVMSQCTARYGDDFCLSLGKA 80 81 CAELNNVPSSMISLSAQQLPQPVSCKMAEMNNPSALWQCIQQYGFCKKLRDACSAMTGASLSTTPWILPQPVSNCM 160 161 RNEMNNPSAMWLCIQKYGIEFCNRLASACAMIKKVTMPTVTINLPEIIASCVASENSQAMCYARKG 226
CL4176Contig1	1 ATLSPTQTPWVIPSTILTICITSGMNNQNTGVINPVVFNPGVPVNPVQINQLVPVNPVVPVPIINPGGPSNTVDVMSQCT 80 81 QKYGVNFCNNLGASCSLNTNVAFFVPGFGGQQLSPMIRSCISYEMISPSVMSQCVAKYGSQFCKNLLANCLSSGTATLPM 160 161 QSPWQIPPVVSSCITSGMAKGTDHNNKDVMTATCIQRYGADFCKNMVGSAAALTDVTLT 218
CL1Contig3790	1 MAICVASQDLMTRCMTLRLGQTCQAVKNCKRRFNTFSSRLPGRLWSLSSELINCLYRPVNRASN. 65

CL14284Contig1	1 PQPIAACMAQGMNGGDHKKEDAMARCIRKYGVTYCNMLASCSVLTNVNYDPSGGQMPGILSECVTAETDEPSAMCQCV 80 81 QKYGTEFCKKRLASCIASCTGMNLPATTPWKLPPVVARCMQHGSNDNRGQGSNDVMSQCIARYGAIEFCQRLARFCYAM 160 161 NSLQYPGETFDPQQQTFTQVARCMKSEMDSPSV 193
L5T6918_40979	1 VMWHCVQKYGQEFCKLAATCSTETNTPLPQQDPWRLPQPIIACMLGKMNNPNPTSKPQSVMSQCTARYGDDFCLSLGKA 80 81 CAELNNVPSSMISLSAQQLPQPVSSCMKAEMNNPSALWQCIQQYGIEFCKKLRDACSAMTGASLSTTTPWILPQPVSNM 160 161 RNEMNN 166
L482T66_91	1 ASTGASLSPQAPWLIPSVIAECMAKGMVNGGRQADDTMAICIQKYGIKFCNIIGAACSVLTQVPFFPQLPGTVQQLPSEL 80 81 RACVRSETQKPNVMTKCEKYGTEFC 106
CL1Contig2535	1 MASEMDSPSVMFECVQRYGTSFCKGLETCTEKTRASLSPLCVDTT 46
CL9795Contig1	1 MNQGDEKKTLMSLCVRRYGADYCNLAACSVLTNLPPFPQTPPSEQNLPPMMHKCK 58
L5T34391_40979	1 PEIIASCVASENSQAMCYARKG 22
L5T34390_40979	1 PEIIASCVASENSQAMCYARKG 22
L5T34388_40979	1 PEIIASCVASENSQAMCYARKG 22
CL1Contig6104	1 PEIIASCVASENSQAMCYARKG 22
L5126T1_4	1 SCIFNGGVIGSCV 13
L3664T26_30	1 GASCSSLTNVAFV 13
CL1Contig2142	1 GASCSSLTNVAFV 13
CL1Contig2140	1 GASCSSLTNVAFV 13
CL1Contig2141	1 GASCSSLTNVAFV 13
L21688T1_1	1 NSNVGIMSCITT 13
L482T66_91	1 SIMWQCVQKYGTEFCKLLQDCSASTGASLSPQAPWLIPSVIAEC 45

En la figura 20, se incluye el alineamiento de la secuencia CUFF.5600.1 con la secuencia del alérgeno Ani s 7 parcial ya descrita.

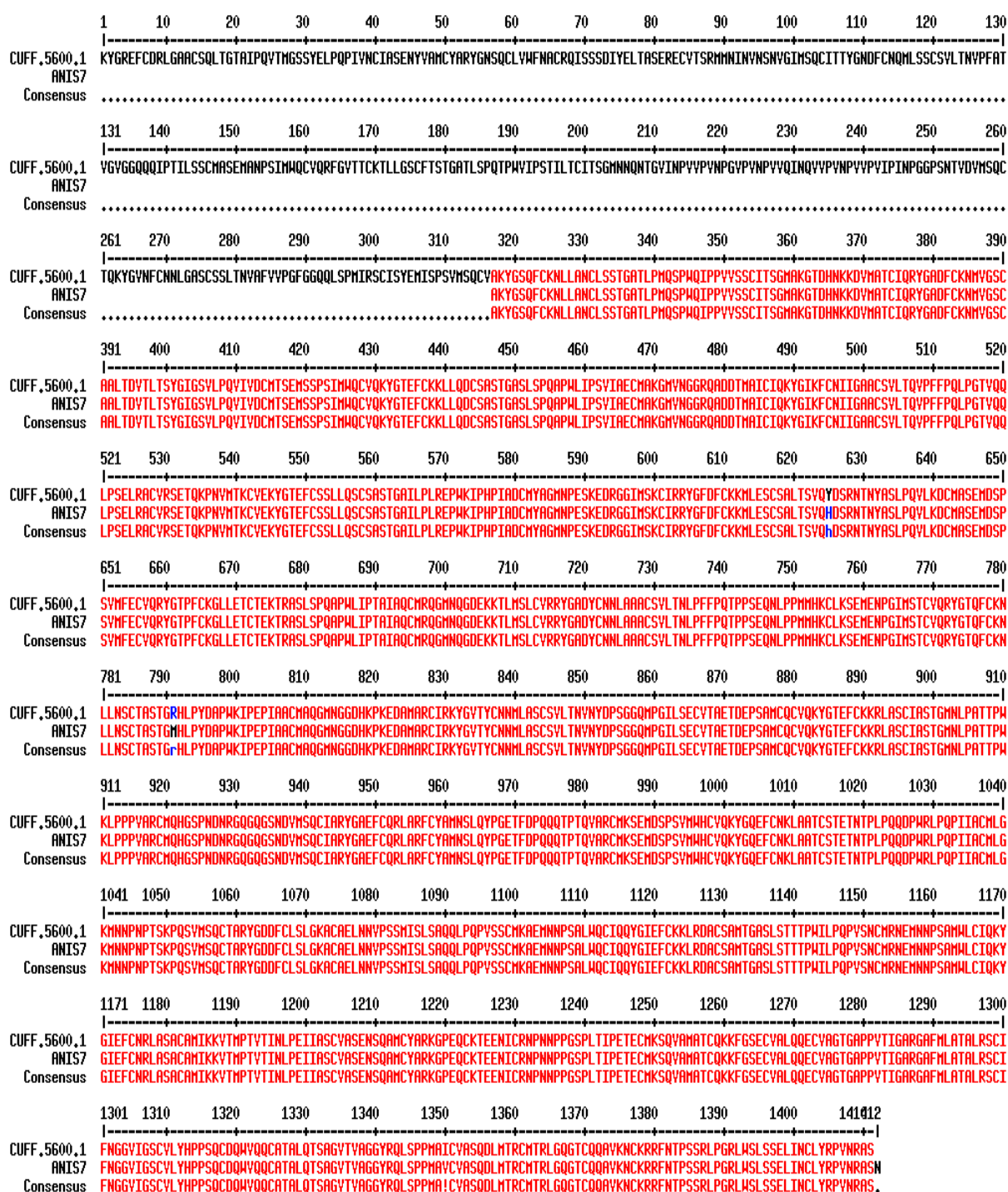


Figura 20. Alineamiento de la secuencia CUFF.5600.1, obtenida de la base de datos MH-E2 con la secuencia descrita de Ani s 7 (ABL77410.1)

Nótese que la secuencia CUFF.5600.1 presenta 316 aminoácidos más en el extremo amino, en comparación con la secuencia de Ani s 7, además de mantener la estructura característica del alérgeno.

Mencionar que la búsqueda de moléculas similares en los bancos de datos por *BLAST* no rindió homologías significativas con otras proteínas ni con alérgenos descritos. A pesar de haber ampliado el extremo amino el gen continuaba incompleto por lo que procedimos a su búsqueda en base de datos públicas.

3.1.2 Comparación del gen teórico obtenido (CUFF) con base de datos públicas

3.1.2.1 Base de datos de secuencias genómicas de *A. simplex* s.l. de Sanger

Una vez realizado el análisis de los diferentes transcritos, obtenidos de la base de datos MH-E1 y MH-E2, se llevó a cabo la búsqueda del gen completo de Anis 7 en la base de secuencias genómicas de Sanger; se determinó que la secuencia correspondiente se localizaba en el *scaffold* 00477.35984. Esta secuencia está formada por el transcrito de 4.757 pb (1.395 aa), ASIM_0001402501, con 27 exones.

En el anexo I, se incluyen las secuencias de cada exón además de la secuencia completa del alérgeno principal Anis 7 en aminoácidos.

Al realizar el alineamiento de las secuencias CUFF.5600.1 y ASIM_0001402501 se observó, en ésta última, un extremo amino completo, con un posible péptido señal compuesto por los primeros 16 aa, deducción obtenida por herramientas bioinformáticas; también la secuencia ASIM_0001402501 presentaba un codón de parada en la posición 1.449 del alineamiento; esta zona coincide con la inserción de 5 aminoácidos (CIFNG) en CUFF.5600.1. Así mismo, es importante mencionar la presencia, en ambas secuencias, de una zona del extremo amino que no mantenía la estructura característica de la secuencia de Anis 7. Dicha zona, rica en prolina y valinas, va de la posición 340 a la 380 de la secuencia y se mantenía tanto en la secuencia obtenida con las bases de datos de Sanger como en las MH (figura 21).

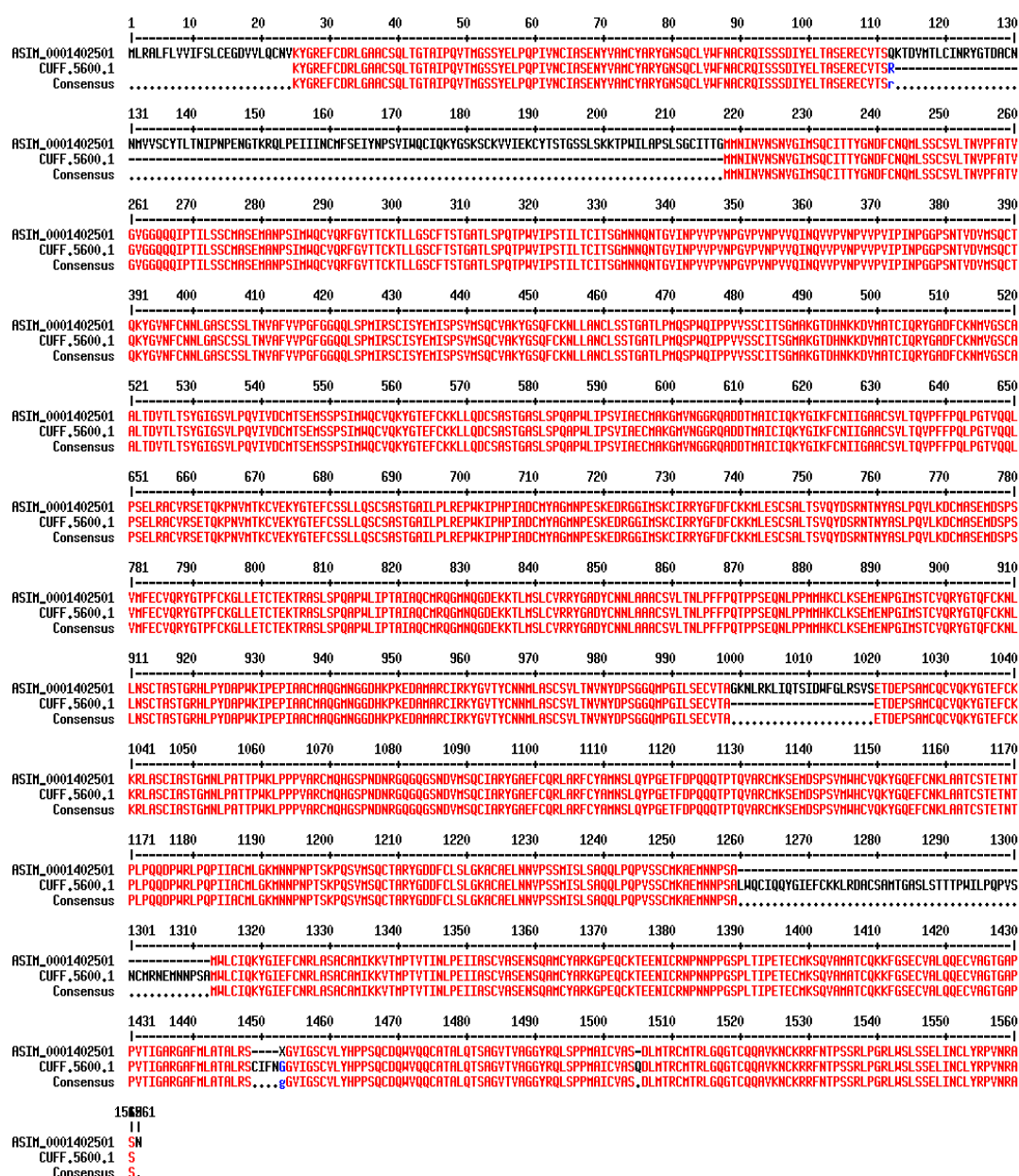


Figura 21. Alineamiento de la secuencia consenso CUFF.5600.1 y su homóloga en el genoma de Sanger (ASIM_0001402501)

En la figura, se observa que en la posición 1369 de la secuencia ASIM_0001402501 un codón de parada (X), mientras que CUFF.5600.1 presenta los aminoácidos CIFNG. Así mismo, se aprecia que en las posiciones 340 a la 380 de ASIM_0001402501 hay una zona que no mantiene la estructura característica de la secuencia de Anis 7.

De nuevo la búsqueda de moléculas similares en los bancos de datos por *BLAST*, utilizando la molécula completa, no rindió homologías significativas con otras proteínas ni con alergenios descritos.

3.1.2.2 Base de datos publicado de transcriptoma de *A. simplex* s.s y *A. pegreffii*

En la búsqueda en la base de datos descrita por Baird *et al.* (2016) de transcritos relacionados con el alérgeno Ani s 7, se encontró una secuencia de 4.592 nt (1.411 aa), correspondiente a *A. simplex* s.s., identificada como Unigene11525_AS1A. El transcrito presentaba una similitud de 99,2% con la secuencia de la base de datos MH-E2, CUFF.5600.1, y 99,1% con la descrita en la base de datos de Sanger (ASIM_0001402501). Dicha secuencia tenía un péptido señal como el descrito en la secuencia ASIM_0001402501. En la figura 22, se incluye el alineamiento de las 3 secuencias mencionadas en este apartado.

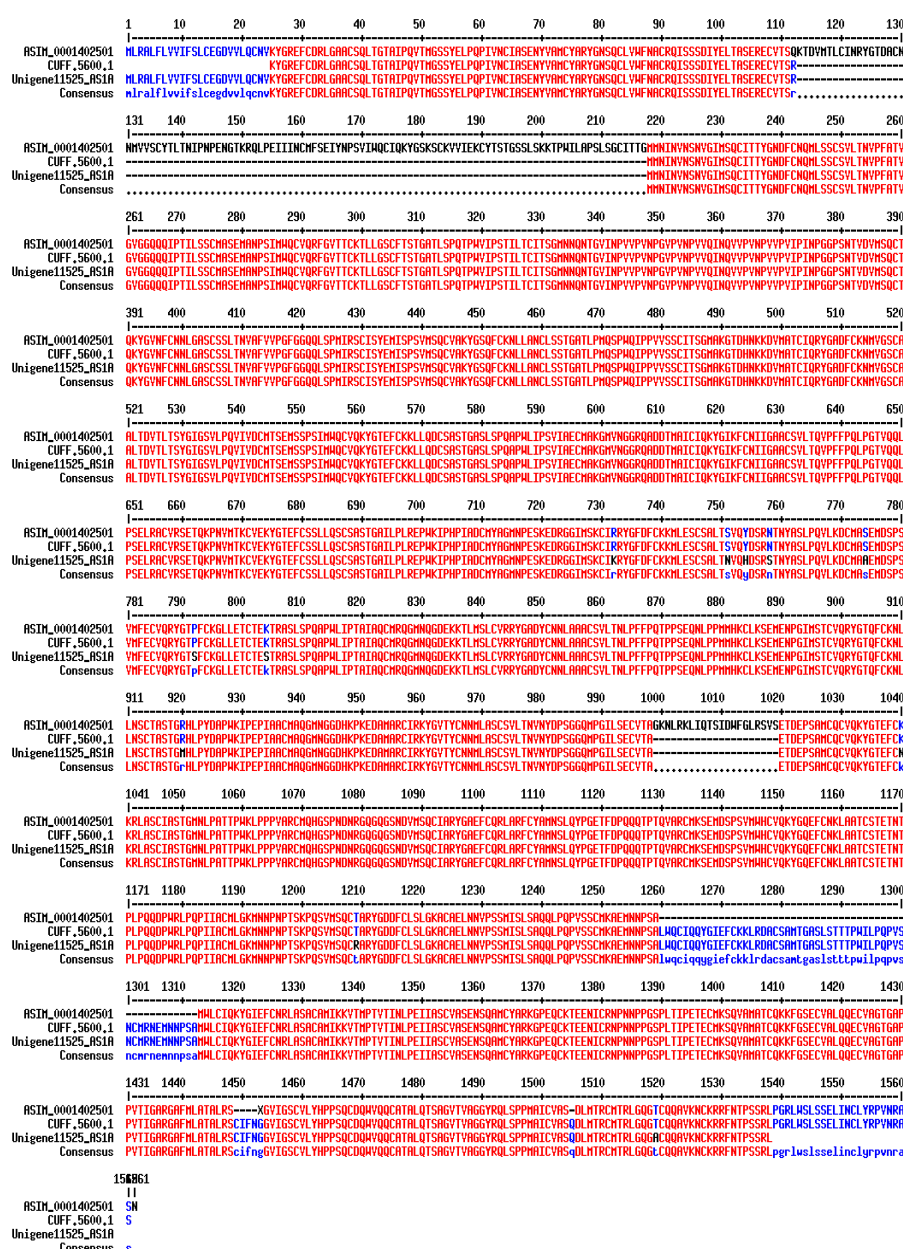


Figura 22. Alineamiento de la secuencia CUFF.5600.1 (base de datos MH-E2), ASIM_0001402501 (genoma de Sanger) y Unigene11525_AS1A (Baird *et al.*, 2016)

Considerando que se disponía de la secuencia teórica completa del gen de Ani s 7, se procedió a confirmar su existencia en una colección de ADNc de la larva 3 de *A. simplex*, mediante el uso de herramientas de biología molecular para su amplificación/clonación/secuenciación.

3.1.3 Verificación del gen Ani s 7 mediante clonación

3.1.3.1 Confirmación de la secuencia mediante amplificación de fragmentos del gen Ani s 7 mediante RACE-PCR y PCR convencional

Para la amplificación del gen se utilizaron un conjunto de cebadores que amplifican diferentes zonas de la secuencia del Ani s 7, para así comprobar la secuencia del alérgeno (tabla 9 del apartado "8. Clonación de los genes que expresan los antígenos de interés en vectores de mantenimiento" de Material y Métodos). En la tabla 20, se resumen las diferentes combinaciones de cebadores utilizados, su respectiva posición en la secuencia de Sanger y el tamaño molecular del producto amplificado obtenido en cada caso.

Tabla 20. Fragmentos obtenidos de la amplificación del gen de Ani s 7 utilizando diferentes combinaciones de los cebadores

Cebadores		Amplificación	
Combinación	Posición en la secuencia de Sanger	Fragmentos obtenidos	Zona amplificada
D1/R1	1-388	>750 pb	Extremo 5' del gen
		>1 kb	
D2/R2	333-729	>1 kb	Extremo 3' del gen
D3/R3	582-884	>1 kb	
D4/R4	880-1216	1 kb	
D5/R5	1193-1541	900 pb	

Así mismo, en la figura 23, se muestran los resultados obtenidos de la amplificación de fragmentos del gen de Ani s 7.

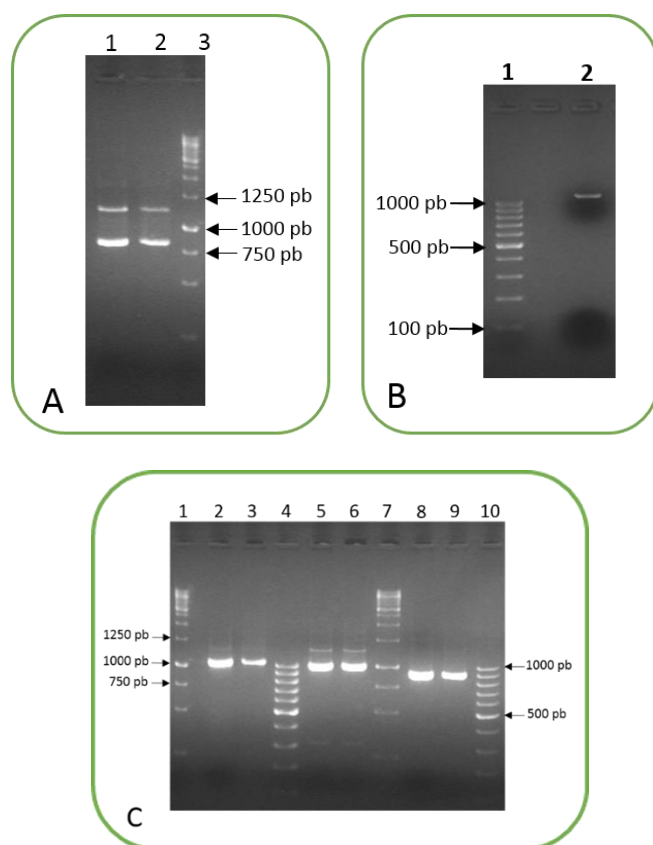


Figura 23. Amplificación de diferentes fragmentos correspondiente al gen de Ani s 7
 A: amplificación de un fragmento del extremo 5' de Ani s 7 con los cebadores D1 y R1. Carriles 2 y 3: bandas de ADN obtenidas con los cebadores D1 y R1; observándose una banda de ADN >750 pb y otra >1 kb, aproximadamente. Carril 3: marcador de peso molecular 1 kb (Biotools). B: amplificación de un fragmento del extremo 5' de Ani s 7 empleando los cebadores D2 y R2. Carril 2: banda de ADN obtenidas con los cebadores D2 y R2, con un tamaño molecular mayor a 1 kb, aproximadamente. Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb (Biotools). C: amplificación de la secuencia correspondiente al extremo 3' del gen. Carriles 2 y 3: amplificación de ADN (1 kb) obtenida con los cebadores D3 y R3 (1 kb). Carriles 5 y 6: amplificación (< 1 kb) mediante los cebadores D4 y R4. Carriles 8 y 9: amplificación obtenida con los cebadores D5 y R5. Carril 1 y 7: marcador de peso molecular 1Kb. Carriles 4 y 10: marcador de peso molecular 100 pb (Biotools).

Una vez que se dispuso de los productos amplificados, se realizó la clonación de los diferentes fragmentos del gen. Los resultados se explican a continuación.

3.1.3.2 Clonación de diferentes fragmentos que conforman el extremo 5' de Ani s 7

El proceso de clonación de los fragmentos que conforman el extremo 5' de Ani s 7, se realizó como se describe en el apartado "8. Clonación de los genes que expresan los antígenos de interés en vectores de mantenimiento" de Material y Métodos. Posteriormente, se llevó a cabo el análisis de las secuencias de los clones obtenidos para cada fragmento. En el anexo II, se encuentran las secuencias (en nt y aa) de los clones seleccionados para cada fragmento.

3.1.3.2.1 Fragmento D1R1

La clonación del fragmento D1R1 se realizó a partir de los productos amplificados de diferentes tamaños (>750pb y >1000 pb), obtenidos en el apartado anterior (figura 23-A). En la figura 24, se muestran los recombinantes positivos, observándose clones de diferentes tamaños correspondientes a este fragmento del gen.

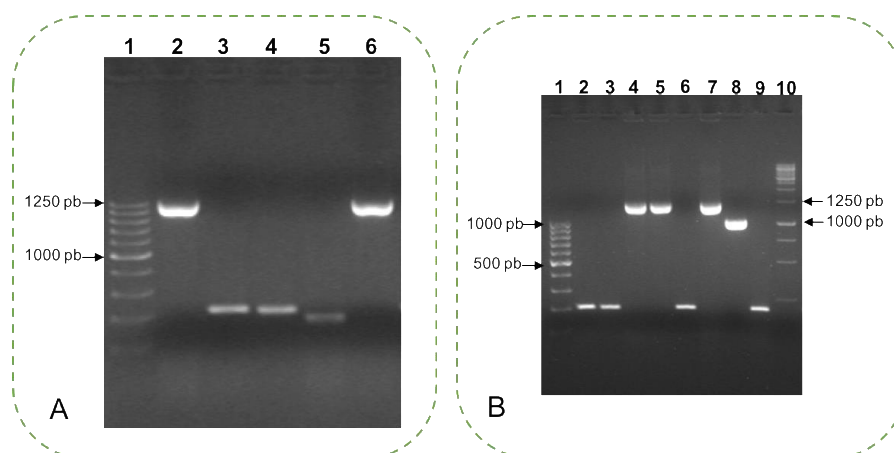


Figura 24. PCR de colonias obtenidas con los productos de amplificación empleando los cebadores D1 y R1
 A. Clones obtenidos a partir del amplificado >750 pb. Carriles 2, 6: recombinantes positivo de 850 pb. Carriles 3-5: colonias negativas (sitio de clonaje múltiple del vector de 200 pb). Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb (Biotools). B. Clones obtenidos a partir del amplificado >1000 pb. Carriles 4, 5, 7 y 8: recombinantes positivos. Carriles 2, 3, 6 y 9: recombinantes negativos (sitio de clonaje múltiple del vector de 200 pb). Carriles 1 y 10: marcador de peso molecular 100 pb y 1 Kb, respectivamente (Biotools).

El análisis de secuencia de los clones confirmó que el fragmento D1R1 corresponde al inicio de la secuencia del gen de Anis 7. Los clones de menor tamaño presentaron 850 nt que se traducen en 283 aa. Las secuencias obtenidas fueron idénticas, desde la posición 1 hasta la 388 de la secuencia teórica ASIM_0001402501. Además, se observó en la secuencia ASIM_0001402501, la inserción de un segmento de 315 nt que no se presentaba en la secuencia de ninguno de los clones analizados (posición 113 hasta 218 del alineamiento). En la figura 25, se muestra la zona del alineamiento correspondiente al fragmento D1R1 con la secuencia ASIM_0001402501.

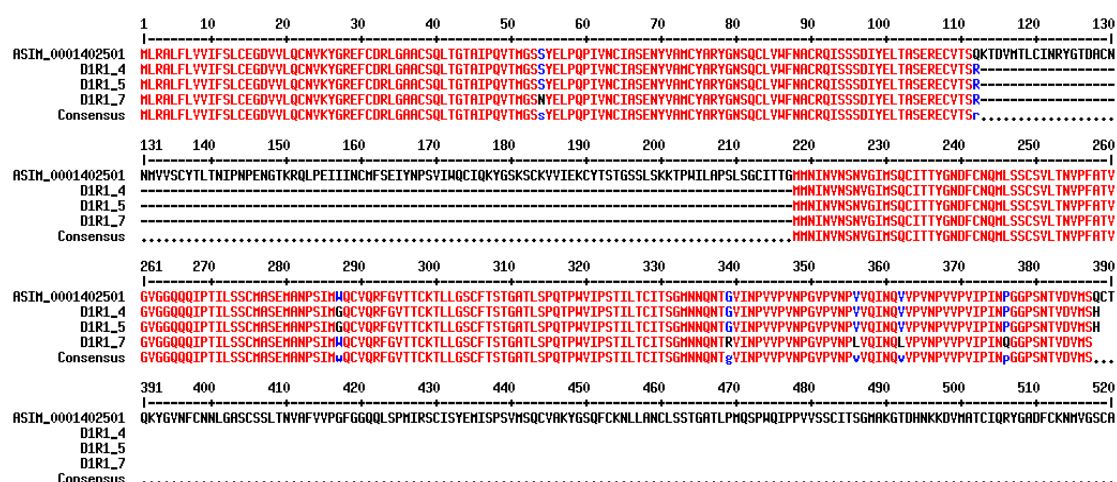


Figura 25. Alineamiento de las secuencias correspondientes al fragmento clonado D1R1 (850 nt) con la secuencia ASIM_0001402501 (Sanger)

Con respecto a los 2 clones de mayor tamaño (>1000 pb) obtenidos, que incluían un fragmento de 1.273 pb (424 aa), se unieron desde la posición 1 hasta la 424 de la secuencia

ASIM_0001402501. En la figura 26, se muestra la zona del alineamiento de este fragmento con la secuencia teórica ASIM_0001402501; observándose que los clones presentan un fragmento de 105 nt (posición 112-147) que no lo presentaban ni los recombinantes de 850 nt, ni la secuencia ASIM_0001402501.

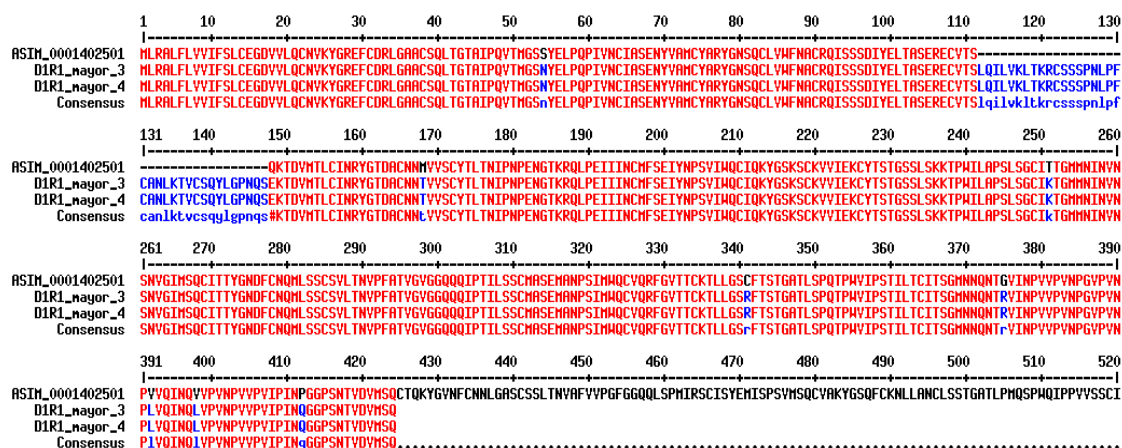


Figura 26. Alineamiento de las secuencias correspondientes al fragmento clonado D1R1 (1.273 nt) con la secuencia ASIM_0001402501 (Sanger)

3.1.3.2.2 Fragmento D2R2

En relación al fragmento clonado D2R2, que corresponde a la secuencia que difiere de la estructura característica de Anis 7, se consiguieron un total de 3 recombinantes que presentaron un tamaño cercano a 1kb (figura 27).

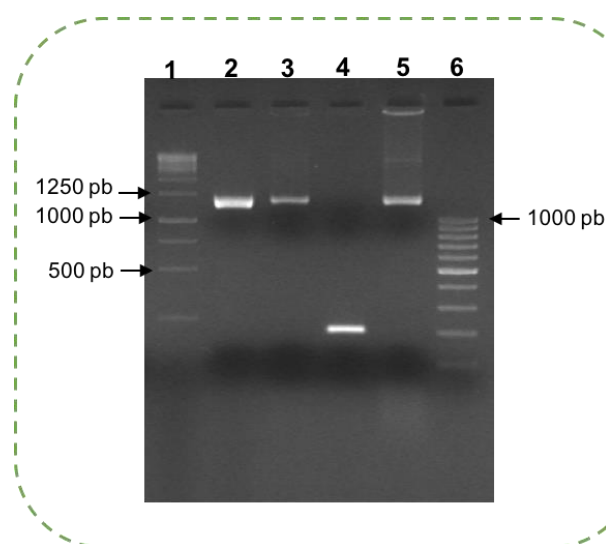


Figura 27. PCR de colonias obtenidas con el producto de amplificación derivado del empleo de los cebadores D2 y R2

Carriles 2, 3 y 5: recombinantes positivo (>1 kb). Carril 4: colonia negativa (sitio de clonaje múltiple del vector de 200 pb). Carril 1 y 6: marcador de peso molecular 1 kb y 100 pb, respectivamente (Biotools).

Se secuenciaron los 3 clones obtenidos, de los cuales uno presentó un tamaño de 1.131 pb (397 aa), mientras que los clones restantes tuvieron un tamaño menor (1.189 nt, 396 aa). El análisis de secuencia confirmó la presencia de este fragmento formando parte de la secuencia del gen de Ani s 7 aunque no conserva el patrón de secuencia repetitiva característica del mismo. En la figura 28, se muestra el alineamiento de los recombinantes del fragmento D2R2 con la secuencia ASIM_0001402501.

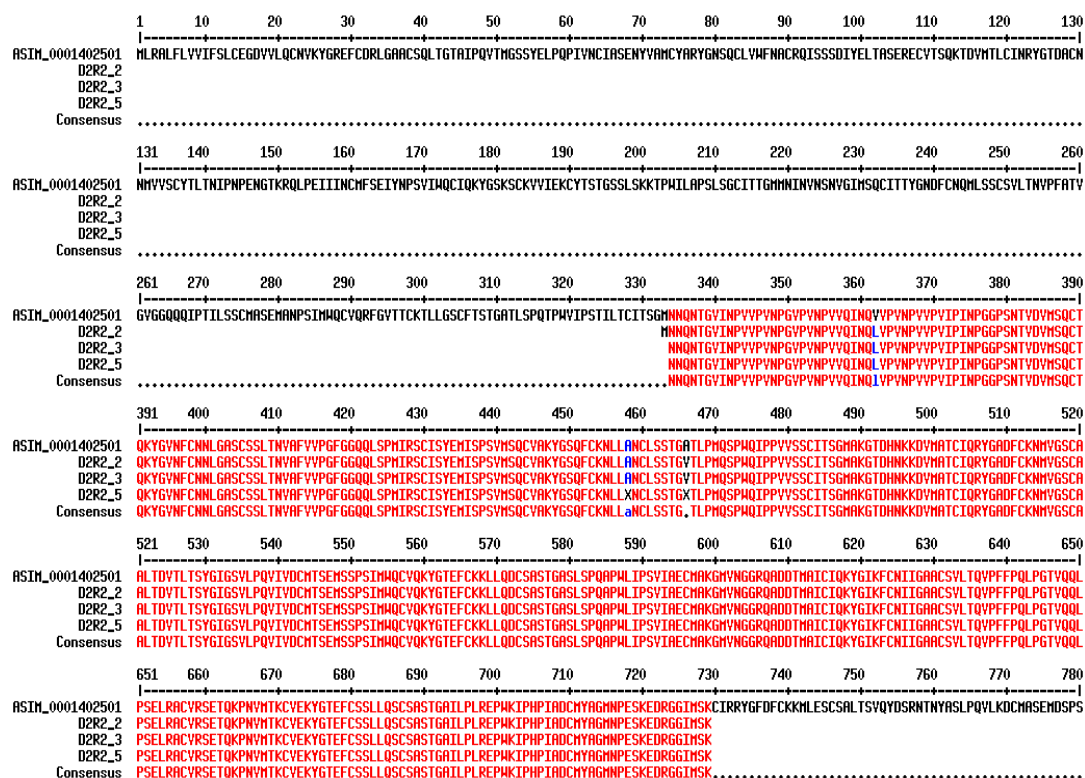


Figura 28. Alineamiento de las secuencias correspondientes al fragmento clonado D2R2 con la secuencia ASIM_0001402501 (Sanger)

3.1.3.3 Clonación del extremo 3' de Ani s 7

Una vez realizada la clonación de los diferentes fragmentos que componen el extremo 3' de Ani s 7, se llevó a cabo el análisis de sus respectivas secuencias. La secuencia de todos los recombinantes positivos obtenidos, no mostraron inserciones o deleciones respecto a la secuencia teórica obtenida por secuenciación. El análisis y alineamiento de las secuencias de los recombinantes positivos reveló un fragmento de 2.439 nt (813 aa) solapante con el final de la secuencia del extremo amino de Ani s 7, descrita en el punto anterior (figura 29). El alineamiento de los fragmentos que conforman el extremo carboxi de Ani s 7 se muestra en la figura 30.

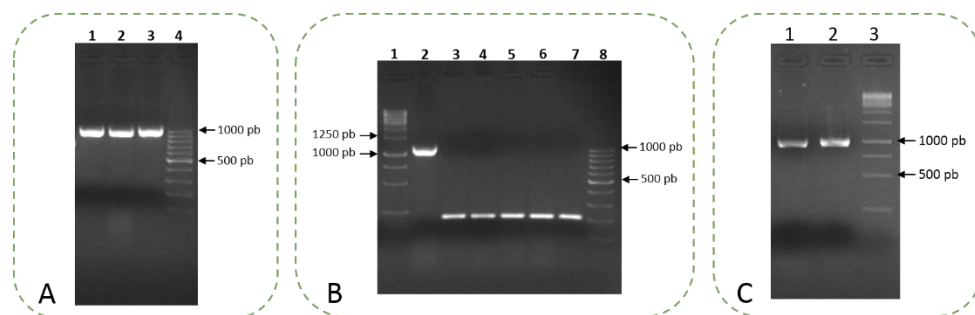


Figura 29. PCR de colonias de los diferentes fragmentos que componen al extremo 3' de Ani s 7

A. Clones obtenidos a partir de la amplificación con los cebadores D3 y R3. Carriles 1-3: recombinantes positivo (1 kb). Carril 4: marcador de peso molecular 100 pb (Biotoools). B. Clones obtenidos a partir de la amplificación con los cebadores D4 y R4. Carril 2: recombinante positivo (1 kb). Carril 3-7: recombinantes negativos (sitio de clonaje múltiple del vector de 200 pb). Carril 1 y 8: marcador de peso molecular 1 kb y 100 pb, respectivamente (Biotoools). C. Clones obtenidos a partir de la amplificación con los cebadores D5 y R5. Carriles 1-2: recombinantes positivos (~1 kb). Carril 3: marcador de peso molecular 1 kb (Biotoools).



Figura 30. Alineamiento de las secuencias correspondientes al fragmento clonado D2R2 con la secuencia ASIM_0001402501 (Sanger)

Las diferencias aminoacídicas se encuentran señaladas con un asterisco rojo.

El alineamiento de las secuencias de los diferentes fragmentos que componen al gen de Ani s 7, rindieron dos secuencias que difieren en el extremo 5' del gen; una secuencia de 4.311 nt (1.437 aa; figura 31) y otra de 4.734 nt (1.578 aa; figura 32) que difieren exclusivamente en la región 113 a 253 (figura 33).

M--LRA-----LFLVVFSLC-----EGDVVLQCNVYKGREFCDRLGAA	
CSQLTGTAIP--QVTMGSSYELPQPIVNCIASE-----NYVAMCYARYGNSQCLVWFNA	
CRQISSSDIY-----ELTASERECVTSRMNNT-----NV-NSNVGIMSQCITTYGNDFCNQMLSS	
CSVLTNVFFA--TVGVGGQQIPTILSSCMASEMA-----NPSIMWQCVQRFVGTTCCKTLGS	
CFTSTGATL---SPQTPWVIPSTILTCITSGMNNQNTGVINPVVFNPGVPVNPVQVQINQLVPVNPVVPVPIINPGGP-SNTVDVMSQCTQKYGVNFCNNLGAS	
CSSLTNVAFVVPVGGG---QQLSPMIRSCISYEMI-----SPSVMSQCVAKYGSQFCCKNLLAN	
CLSSGTGVLTP--MQSP---WQIPPVVSSCITSGMAKG-----TD-HNKKDVMATCIQRYGADFCCKNMVGS	
CAALTDVTLT--SY--GIGSVLPQVIIVDCMTSEMS-----SPSIMWQCVQKYGTFCCKLLQD	
CSASTGASL---SPQAPWLIPSVIAECMAKGMVNG-----G-RQADDTMAICIQKYGIKFCNNIIGAA	
CSVLTVQVFF--PQLPGTVQQLPSELRAVCVRSETQ-----KPNVMTKCKVEKYGTFCCKSLLQS	
CSASTGAILP--LREP---WKIPHPADIADCMYAGMNPES-----SK-EDRGGIMSKCIRRYGDFCCKMLES	
CSALTSVQHD--SRN-TNYASLPQVLKDCMASEMD-----SPSVMFECVQRYGTPFCCKGLLET	
CTEKTRASL---SPQAPWLIPSAIAQCMRQGMNQ-----G-DEKKTLMSLCVRRYGADYCNLLAAA	
CSVLTNLPPF--PQTPPSEQLPPMMHKCLKSEME-----NPGIMSTCVQRYGTFCCKNLLNS	
CTASTGMHLP--YDAP---WKIPQPIAACMAQGMNGG-----DH-KPKEDAMARCIKRYGVTYCNMMLAS	
CSVLTNVNYD--PSG---GQMPGILSECVTAETD-----EPSAMCQCVQKYGTFCCKNRLAS	
CTASTGMNL--PATTP---WKLPPPVARCMQHGSPNDN-----RGQG-QGSNDVMSQCIARYGAFCQRLARF	
CYAMNSLQYP--GETFDQQQTPTQVARCMKSEMD-----SPSVMWHCVQKYGTFCCKNLAAT	
CSTETNTPLP--QDDP---WRLPQPIAACMLGKMNP-----NPTSKPQSVMSQCTARYGDDFCCLSLGKA	
CAELNNVPSS--MISLSA-QQLPQPVSSCKMAEMN-----NPSALWQCIQYGIKFCCKLRDA	
CSAMTGASL--T--TTP-WILPQPVSNCMRNEMN-----NPSAMWLCIQKYGIKFCCKNRLASA	
CAMIKKVTMP--TVT---INLPEIIASCVASE-----NSQAMCYARKGPEQCKTEENI	
CRNPNNP-----PGSPLTIP--ETECMKSQ-----VAMATCQKKFGSE-CVALQQE	
CVAGTGAPPV--TIGARGAFMLATALRSCIFNG-----GVIGSCVLYHPPSQCDQWVQQ	
CATALQTSAG--VTVAGGYRQLSPMAICVASQ-----DLMTRCMTRLGGGTCCQAVKN	
CKRRFNTSS--R-LPGRLLWSLSSELINCLYRPVN-----RAS	

Figura 31. Secuencia correspondiente al gen del alérgeno Ani s 7 de 1.437 aa

ML--R-----LFLVVFSLC-----EGDVVLQCNVYKGREFCDRLGAA	
CSQLTGTAIP--AIQVIMGS--NYELPQPIVNCIASE-----NYVAMCYARYGNSQCLVWFNA	
CRQISSSDIY-----DIY-----ELTASERECVTSLOI-----L-VKLTKRCS SSPNLPPCANLKTIV	
CSQYLGE--N-----QSE-----K-TDVTLCINRYGTDAACNNTVVS	
CYTLTNT--PNPENG--T-KRQLPEIINCMFSEIY-----N-PSVINWQCIQKYGSCKVIEK	
CYTSTGS--SL--SKKT-PWILAPSLSGCIKTGMNNIN-----V-NSNVGIMSQCITTYGNDFCNQMLSS	
CSVLTNV--PFATVGVGG--QQIPTILSSCMASEMA-----N-PSIMWQCVQRFVGT-----T	
CKTLGSRFTSTGATL--SPQT-PWVIPSTILTCITSGMNNQNTG--VINPVVFNPGVPVNPVQVQINQLVPVNPVVPVPIINPGGP-SNTVDVMSQCTQKYGVNFCNNLGAS	
CSSLTNV--AFVVPGE--G-QQLSPMIRSCISYEMI-----S-PSVMSQCVAKYGSQFCCKNLLAN	
CLSSGTGV--TLPMQ--S-PWQIPPVVSSCITSGMA-----KG--TD-HNKKDVMATCIQRYGADFCCKNMVGS	
CAALTDV--TLTSYG--I-GSVLPQVIIVDCMTSEMS-----S-PSIMWQCVQKYGTFCCKLLQD	
CSASTGA--SL--SPQA-PWLIPSVIAECMAKGMVNG-----G-RQADDTMAICIQKYGIKFCNNIIGAA	
CSVLTVQV--PFFPQLPGT--VQQLPSELRAVCVRSETQ-----K--PNVMTKCKVEKYGTFCCKSLLQS	
CSASTGA--ILPL--RE-PWKIPHPADIADCMYAGMNPES-----K-EDRGGIMSKCIRRYGDFCCKMLES	
CSALTSV--QHDSRNT--N-YASLPQVLKDCMASEMD-----S-PSVMFECVQRYGTPFCCKGLLET	
CTEKTRA--SL--SPQA-PWLIPSAIAQCMRQGMNQ-----G-DEKKTLMSLCVRRYGADYCNLLAAA	
CSVLTNL--PFFPQTTPS--EQNLPPMMHKCLKSEME-----N-PGIMSTCVQRYGTFCCKNLLNS	
CTASTGM--HLPY--DA-PWKIPQPIAACMAQGMNGG-----H-KPKEDAMARCIKRYGVTYCNMMLAS	
CSVLTNV--NYDPS--GGQMPGILSECVTAETD-----E-PSAMCQCVQKYGTFCCKNRLAS	
CTASTGM--NL--PAT-T-PWKLPPPVARCMQHGSPNDNRGQG--S--NDVMSQCIARYGAFCQRLARF	
CYAMNSL--QYPGET--FDQQQTPTQVARCMKSEMD-----S-PSVMWHCVQKYGTFCCKNLAAT	
CSTETNT--PLPQ--QD-PWRLPQPIAACMLGKMNNEN-----E-PTSKPQSVMSQCTARYGDDFCCLSLGKA	
CAELNNV--PSSMIS--LS-AQQLPQPVSSCKMAEMN-----S-PSALWQCIQYGIKFCCKLRDA	
CSAMTGA--SLST--TT-PWILPQPVSNCMRNEMN-----S-PSAMWLCIQKYGIKFCCKNRLASA	
CAMIKKV--TMPT--V-TINLPEIIASCVASE-----NSQAMCYARKGPEQCKTEENI	
CRNPNNP--P--GS-PLTIP--ETECMKSQ-----VAMATCQKKFGSE-CVALQQE	
CVAGTGA--PVTIGARG--AFMLATALRSCIFN-----GVIGSCVLYHPPSQCDQWVQQ	
CATALQTSAG--SAGVTIVAGG--YRQLSPMAICVASQ-----DLMTRCMTRLGGGTCCQAVKN	
CKRRFNT--PSSR-LPGR-LWSLSSELINCLYRPVN-----AS--N	

Figura 32. Secuencia correspondiente al gen del alérgeno Ani s 7 de 1.578 aa

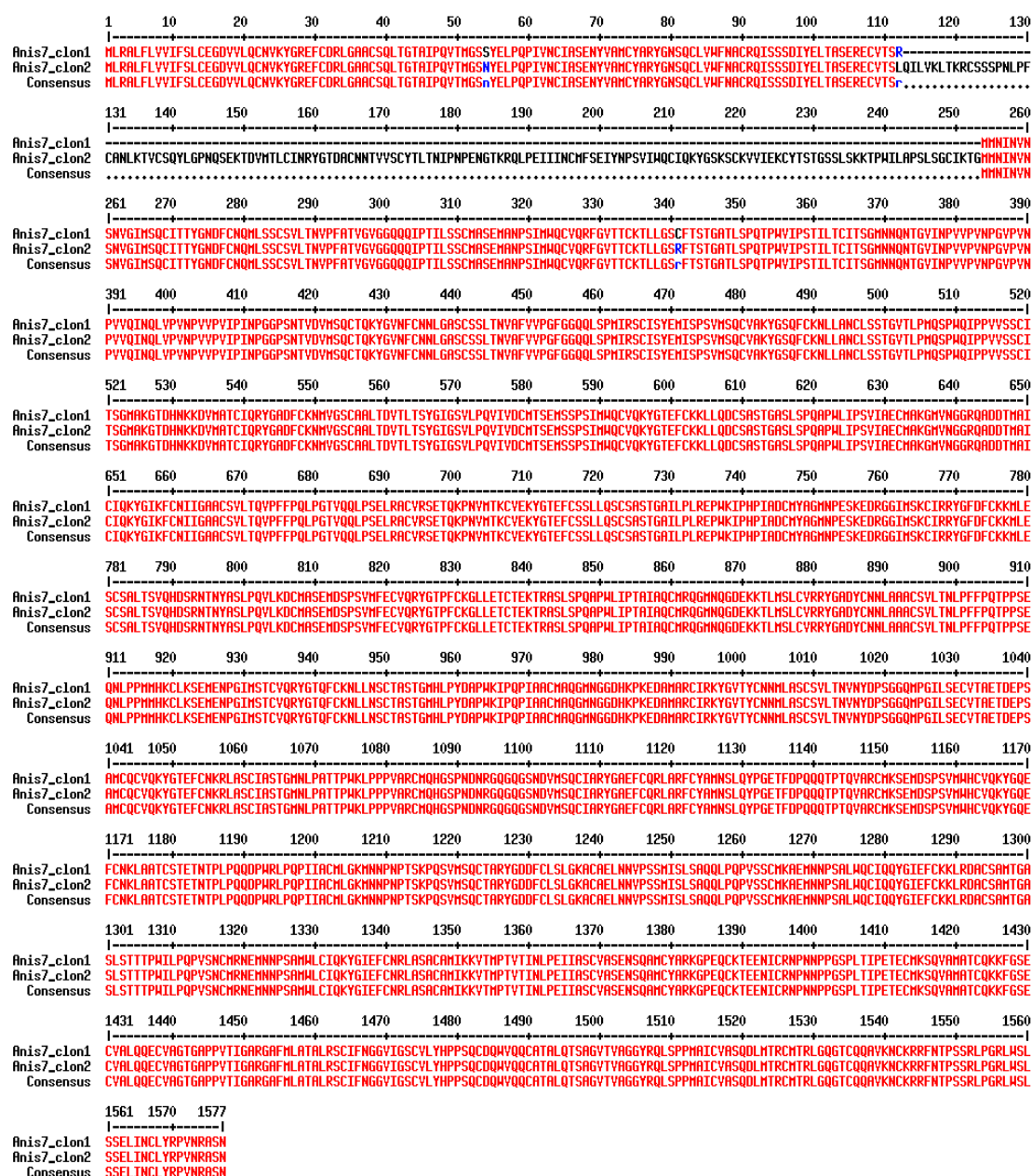


Figura 33. Alineamiento de las secuencias de los genes de Ani s 7

Al realizar el estudio comparado de las secuencias aminoacídicas de Ani s 7 en *A. simplex* s.s. (Unigene11525_AS1A) y *A. pegreffii* (CL1065.Contig2_AP1A), publicadas por Baird *et al.* (2016), se apreció que presentaban 19 diferencias entre ellas. Estas diferencias se compararon con las secuencias de dos clones de Ani s 7 obtenidos en el presente trabajo; así se determinó que de las 19 diferencias, el clon 1 coincide en 14 aminoácidos con *A. simplex* s.s. y en 5 residuos con *A. pegreffii*. El clon 2 tiene 13 aminoácidos en la misma posición que la secuencia homóloga de *A.*

simplex s.s. y 6 de *A. pegreffii* (tabla 21). La secuencia solapante del clon 1 y 2 presenta dos cambios aminoacídicos (tabla 22).

Tabla 21. Diferencias entre Ani s 7 de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*

En la tabla se resumen los aminoácidos de Ani s 7 en que difieren *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, y su respectiva posición en la secuencia; además se incluye los aa correspondientes de los clones 1 y 2, obtenidos en el presente trabajo. Se señalan en rojo los aminoácidos compartidos con *A. simplex* s.s. y en verde con *A. pegreffii*.

	Posición																		
	54	310	375	392	398	412	460	494	756	768	787	794	810	840	927	956	1.055	1.156	1.217
<i>A. simplex</i> s.s.	S	S	G	V	V	P	S	A	K	K	N	S	A	S	N	M	N	S	Q
<i>A. pegreffii</i>	N	G	E	L	L	Q	P	S	E	R	S	N	S	K	S	R	K	N	E
Clon 1	S	S	G	V	L	P	S	A	K	R	S	N	S	K	N	M	N	S	Q
Clon 2	N	S	G	V	L	P	S	A	K	R	S	N	S	K	N	M	N	S	Q

Tabla 22. Diferencias aminoacídicas en los clones de Ani s 7

En la tabla se representan los aminoácidos que difieren entre los dos clones de Ani s 7 obtenidos en el presente trabajo indicando la posición en la secuencia.

Clones	Posición	
	112	341
1	R	C
2	L	R

La secuencia de Ani s 7 presenta posibles sitios de unión al AcM UA3 descritos por Rodríguez *et al.* (2008). El análisis de la secuencia de este epitopo (en las secuencias teóricas de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, publicadas por Baird *et al.* (2016) así como en los clones de Ani s 7 obtenidos en el presente trabajo), mostró que está formada por una secuencia central que mantiene mayoritariamente la siguiente estructura: CXXKYGX(E)(F)CXK. En la tabla 23, se muestran los posibles sitios de reconocimiento específicos (epitopos) para el AcM UA3; dichos sitios mantienen la estructura mencionada anteriormente, presentes en las secuencias analizadas.

Tabla 23. Posibles sitios de unión al AcM UA3 en Ani s 7

En la tabla se exponen los aa iniciales y finales, así como la secuencia central de los posibles epitopos UA3, encontrados en Ani s 7 de las especies *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, y en los clones correspondientes al alérgeno obtenidos en el presente estudio. Los aminoácidos conservados en la secuencia inicial y final de cada péptido se resaltan en rojo mientras que en la secuencia central se marcan en verde; también se indica la posición en la secuencia. Las diferencias de aa entre las 4 secuencias se encuentran subrayadas.

Nº	<i>A. simplex</i> s.s.			<i>A. pegreffii</i>			Clon 1			Clon 2			Posición
	aa iniciales	Secuencia central	aa finales	aa iniciales	Secuencia central	aa finales	aa iniciales	Secuencia central	aa finales	aa iniciales	Secuencia central	aa finales	
1	VLQ	CNVKYGREFCDR	LGA	VLQ	CNVKYGREFCDR	LGA	VLQ	CNVKYGREFCDR	LGA	VLQ	CNVKYGREFCDR	LGA	19-36
2	VAM	CYARYGNSQCLV	WFN	VAM	CYARYGNSQCLV	WFN	VAM	CYARYGNSQCLV	WFN	VAM	CYARYGNSQCLV	WFN	71-88
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CINRYGTACNN	TVV	153-170
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CIQKYGSKCKV	VIE	207-224
5	MSQ	CITTYGNDFCNQ	MLS	MSQ	CITTYGNDFCNQ	MLS	MSQ	CITTYGNDFCNQ	MLS	MSQ	CITTYGNDFCNQ	MLS	266-280
6	MWQ	CVQRFVTTCKT	LLG	MWQ	CVQRFVTTCKT	LLG	MWQ	CVQRFVTTCKT	LLG	MWQ	CVQRFVTTCKT	LLG	322-339
7	MSQ	CTQKYGVNFCNN	LGA	MSQ	CTQKYGVNFCNN	LGA	MSQ	CTQKYGVNFCNN	LGA	MSQ	CTQKYGVNFCNN	LGA	422-439
8	MSQ	CVAKYGSQFCKN	LLA	MSQ	CVAKYGSQFCKN	LLS	MSQ	CVAKYGSQFCKN	LLA	MSQ	CVAKYGSQFCKN	LLA	477-494
9	MAT	CIQRYGADFCKN	MVG	MAT	CIQRYGADFCKN	MVG	MAT	CIQRYGADFCKN	MVG	MAT	CIQRYGADFCKN	MVG	536-553
10	MWQ	CVQKYGTEFCKK	LLQ	MWQ	CVQKYGTEFCKK	LLQ	MWQ	CVQKYGTEFCKK	LLQ	MWQ	CVQKYGTEFCKK	LLQ	590-607
11	MAI	CIQKYGIKFCNI	IGA	MAI	CIQKYGIKFCNI	IGA	MAI	CIQKYGIKFCNI	IGA	MAI	CIQKYGIKFCNI	IGA	648-665
12	MTK	CVEKYGTEFCSS	LLQ	MTK	CVEKYGTEFCSS	LLQ	MTK	CVEKYGTEFCSS	LLQ	MTK	CVEKYGTEFCSS	LLQ	704-721
13	MSK	CIKRYGDFCKK	MLE	MSK	CIRRYGDFCKK	MLE	MSK	CIRRYGDFCKK	MLE	MSK	CIRRYGDFCKK	MLE	763-780
14	MFE	CVQRYGT ^S FCKG	LLE	MFE	CVQRYGT ^S FCKG	LLE	MFE	CVQRYGT ^P FCKG	LLE	MFE	CVQRYGT ^P FCKG	LLE	818-835
15	MSL	CVRRYGADYCINN	LAA	MSL	CVRRYGADYCINN	LAA	MSL	CVRRYGADYCINN	LAA	MSL	CVRRYGADYCINN	LAA	875-892
16	MST	CVQRYGTQFCKN	LLN	MST	CVQRYGTQFCKN	LLN	MST	CVQRYGTQFCKN	LLN	MST	CVQRYGTQFCKN	LLN	931-948
17	MAR	CIRKYGVTYCINN	MLA	MAR	CIRKYGVTYCINN	MLA	MAR	CIRKYGVTYCINN	MLA	MAR	CIRKYGVTYCINN	MLA	990-997
18	MCQ	CVQKYGTEFC ^{NK}	RLA	MCQ	CVQKYGTEFC ^{KK}	RLA	MCQ	CVQKYGTEFC ^{NK}	RLA	MCQ	CVQKYGTEFC ^{NK}	RLA	1.042-1.059
19	MSQ	CIARYGA ^E FCQR	LAR	MSQ	CIARYGA ^E FCQR	LAR	MSQ	CIARYGA ^E FCQR	LAR	MSQ	CIARYGA ^E FCQR	LAR	1.104-1.121
20	MWH	CVQKYGQ ^E FCNK	LAA	MWH	CVQKYGQ ^E FCNK	LAA	MWH	CVQKYGQ ^E FCNK	LAA	MWH	CVQKYGQ ^E FCNK	LAA	1.160-1.177
21	MSQ	CRARYGDD ^F CLS	LGK	MSQ	CRARYGDD ^F CLS	LGK	MSQ	CTARYGDD ^F CLS	LGK	MSQ	CTARYGDD ^F CLS	LGK	1.220-1.237
22	LWQ	CIQQYGI ^E FCKK	LRD	LWQ	CIQQYGI ^E FCKK	LRD	LWQ	CIQQYGI ^E FCKK	LRD	LWQ	CIQQYGI ^E FCKK	LRD	1.275-1.292
23	MWL	CIQKYGI ^E FCNR	LAS	MWL	CIQKYGI ^E FCNR	LAS	MWL	CIQKYGI ^E FCNR	LAS	MWL	CIQKYGI ^E FCNR	LAS	1.328-1.345
24	QAM	CYARKGPE ^Q CKT	EEN	QAM	CYARKGPE ^Q CKT	EEN	QAM	CYARKGPE ^Q CKT	EEN	QAM	CYARKGPE ^Q CKT	EEN	1.375-1.393
25	MAT	CQKKFGSE ^C V	LQQ	MAT	CQKKFGSE ^C V	LQQ	MAT	CQKKFGSE ^C V	LQQ	MAT	CQKKFGSE ^C V	LQQ	1.420-1.436
26	IGS	CVLYHPPSQ ^C DQ	WVQ	IGS	CVLYHPPSQ ^C DQ	WVQ	IGS	CVLYHPPSQ ^C DQ	WVQ	IGS	CVLYHPPSQ ^C DQ	WVQ	1.471-1.498
27	MTR	CMTRLGQGAC ^Q Q	AVK	MTR	-	-	MTR	CMTRLGQGT ^C QQ	AVK	MTR	CMTRLGQGT ^C QQ	AVK	1.523-1.540

De la tabla anterior se puede deducir que el epitopo está bastante conservado y altamente repetido en todas las secuencias. En la tabla 24, se resumen el número de repeticiones y cuáles de ellas conservan la secuencia propuesta para el reconocimiento por el AcM UA3 (Rodríguez *et al.*, 2008).

Tabla 24. Número de posibles epitopos de unión al AcM UA3 en Ani s 7

En la tabla se resumen el número de repeticiones del epitopo así como el número de epitopos más conservados obtenidos en la tabla 23.

	Nº epitopos repetido	Nº epitopos necesarios para el reconocimiento
<i>A. simplex</i> s.s.	25	5
<i>A. pegreffii</i>	24	5
Clon 1	25	5
Clon 2	27	5

3.1.4 Identificación de parálogos del alérgeno Ani s 7

Simultáneamente, durante la búsqueda de transcritos correspondientes al alérgeno Ani s 7, se obtuvieron un grupo de secuencias correspondientes a parálogos del gen, según se identifican en la base de datos Sanger, que presentaban una estructura similar de repeticiones en tándem con el alérgeno citado pero que diferían en la composición de secuencia. En la tabla 24, se muestran los diferentes transcritos correspondiente a estas nuevas moléculas.

La base de datos de Sanger mostraba secuencias incompletas de estos parálogos, incluso dos fragmentos correspondientes a un único parólogo anotados como 2 secuencias diferentes. Los resultados de la búsqueda en nuestra base de datos combinadas con las de Baird *et al.* (2016) y Sanger se resumen a continuación.

Tabla 25. Genes parálogos de Ani s 7

Se resumen las secuencias parálogas obtenidas a partir de las bases de datos MH-E1, MH-E2 y la publicada por Baird *et al.*, 2016 y Sanger; con el número de aa correspondiente (entre paréntesis) y la estructura repetida de la secuencia consenso para cada una (C: cisteína; X: cualquier aa). Además se indica, junto a la estructura, la presencia o no del epitopo AcM UA3 (CXXKYGX(E)(F)CXK) en las secuencias; en caso de estar presente se señala la posición en la secuencia (entre paréntesis).

	Consenso	E1	E2	Baird <i>et al.</i> , 2016 (aa)	Sanger	Estructura y presencia de epitopo UA3
		Contig (aa)	CUFF (aa)			
P7-1	227 aa	Contig2487 Contig2488 Contig2489 Contig2490 (227 aa)	CUFF. 10153 (47 aa) CUFF. 10155 (79 aa)	Unigene12117 _AS1A (234 aa)	ASIM_ 0001926001 (113 aa) ASIM_ 0001780901 (160 aa)	(CX ₉₋₁₈ CX ₈ CX ₆ CX ₁₈₋₂₆) ₄ Epitopo ausente

P7-2	282 aa	CL1499Contig 1 (155 aa)	CUFF. 7617.1 (179 aa)	Unigene8935 _AS1A (266 aa)	ASIM_ 0001558101 (230 aa)	(CX ₉₋₂₆ CX ₇₋₈ CX ₆ CX ₂₁₋₃₀) ₅ Epitopo presente: CIKKYSKTFCSR (27-38) CIAKMGQEA-CSK (183-195)
P7-3	1.045 aa	L5T8839_4097 9 (392 aa)	CUFF. 6891 (300 aa)	Unigene12573 _AS1A (1.045 aa)	ASIM_ 0001499501 (221 aa)	(CX ₉ CX ₈ CX ₆ CX ₁₇₋₂₅) ₁₈ Epitopo presente: CIAKYGNEFCQK (74-86) CLKYGREFCCK (223-235)

3.1.4.1 Parálogo P7-1

El gen P7-1 está formado por 681 nt que se traducen en 227 aa, con un peso molecular teórico de 24,97 KDa. Los primeros 18 aminoácidos corresponden a una posible secuencia péptido señal. La arginina 28 (marcada en rojo; figura 34) podría formar parte de un posible sitio de N-glicosilación, determinado mediante herramientas bioinformáticas. Presenta un 39% y 28% de similitud con los alérgenos Ani s 7 y Ani s 12, respectivamente. En la tabla 24, se señalan los *contigs* que conforman el gen y en la figura 34, se ilustra la estructura repetida de la secuencia. En la figura 35, se muestra el alineamiento de P7-1 con las dos secuencias obtenidas de la base de datos de Sanger (ASIM_0001926001 y ASIM_0001780901).

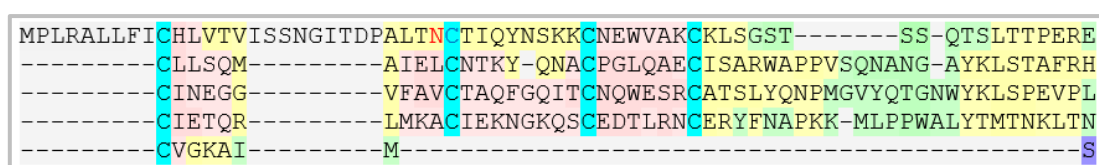


Figura 34. Secuencia correspondiente a la proteína P7-1

Presenta una estructura de repeticiones en tándem (CX₉₋₁₈CX₈CX₆CX₁₈₋₂₆) con 4 cisteínas conservadas (azul); una arginina, N₂₈ (N en rojo) posible sitio de N-glicosilación.

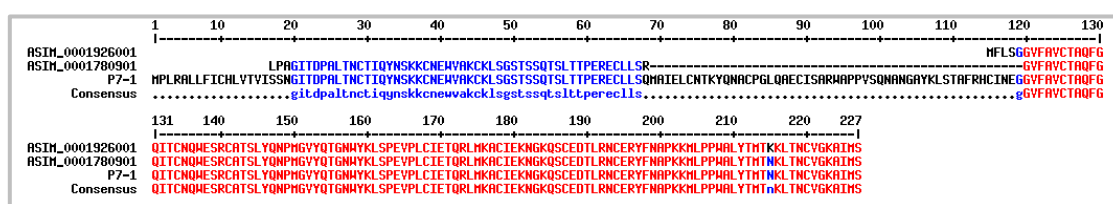


Figura 35. Alineamiento de la secuencia de P7-1 con las obtenidas en la base de datos de Sanger

3.1.4.2 Parálogo P7-2

Presenta un peso molecular teórico de 31,02 kDa. El gen está formado por 846 nt que expresan un polipéptido de 282 aa, de los cuales los primeros 23 corresponden a un posible

péptido señal. Con un sitio de N-glicosilación, determinado por herramientas bioinformáticas, en la posición 87 (NCT; figura 36). En la figura 37, se muestra el alineamiento del parólogo con la secuencia ASIM_0001558101, obtenida con la base de datos de Sanger. Presenta un 35% de similitud con Ani s 7, 33% con Ani s 12 y 47% con Ani s 14; en el caso de Ani s 14, la similitud muestra un porcentaje de cobertura (*query cover*) menor a los obtenidos con Ani s 7 y Ani s 12, mediante BLAST. Presenta dos posibles sitios de reconocimiento por el AcM UA3: CIKKYSKTFCSR, ubicado en la posición 27-38, y otro CIAKMGQEA-CSK en la posición 183-195.

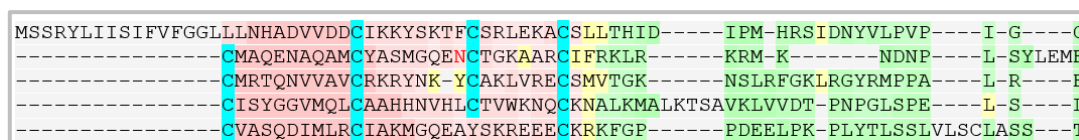


Figura 36. Secuencia correspondiente a la proteína P7-2

Se observa que mantiene la estructura de repeticiones en tándem ($CX_{9-26}CX_{7-8}CX_6CX_{21-30}$) con cisteínas conservadas (azul). El sitio de posible N-glicosilación se caracteriza por presencia de residuo de arginina en posición 87 (N en rojo).

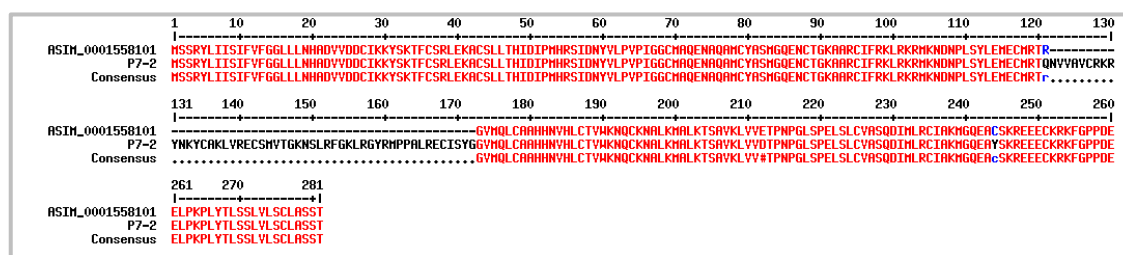


Figura 37. Alineamiento de la secuencia de P7-2 con la obtenida en la base de datos de Sanger

3.1.4.3 Parólogo P7-3

El gen de P7-3 está constituido por 3.135 nt (1.045 aa). Presenta un peso molecular teórico de 114,95 kDa. El gen no está completo y carece de péptido señal, según herramientas bioinformáticas estándar. Con un posible sitio de N-glicosilación en el residuo de arginina 603 (figura 38). En la figura 39, se muestra el alineamiento del parólogo P7-3 con la secuencia ASIM_0001499501, obtenida a través de la base de datos de Sanger. Presenta un 27% de similitud con Ani s 7, mientras que con Ani s 12 y Ani s 14 muestra una similitud de 33% y 35% pero bajo porcentaje de cobertura (*query cover*) en comparación con la obtenida con Ani s 7. Muestra 2 posibles sitios de unión al AcM UA3 ubicados en la posición 74-86 (CIAKYGNFECQK) y 223-235 (CLKKYGREFCKK).

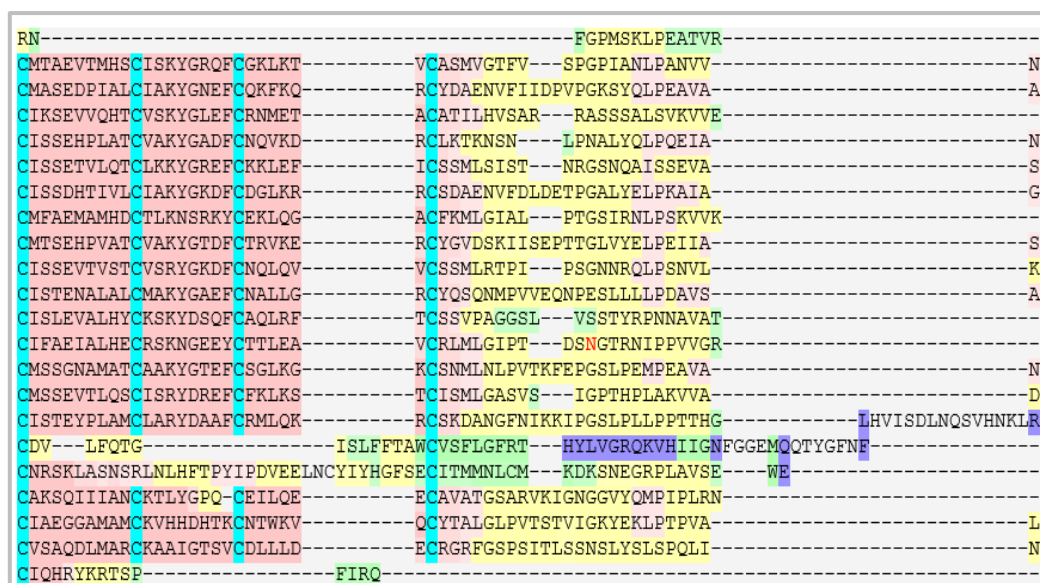


Figura 38. Secuencia correspondiente a la proteína P7-3

Presenta una estructura de repeticiones en tándem (CX₉CX₈CX₆CX₁₇₋₂₅) con cisteínas conservadas (azul). El sitio de posible N-glicosilación se caracteriza por presencia de residuo de arginina en marcado en rojo (N).

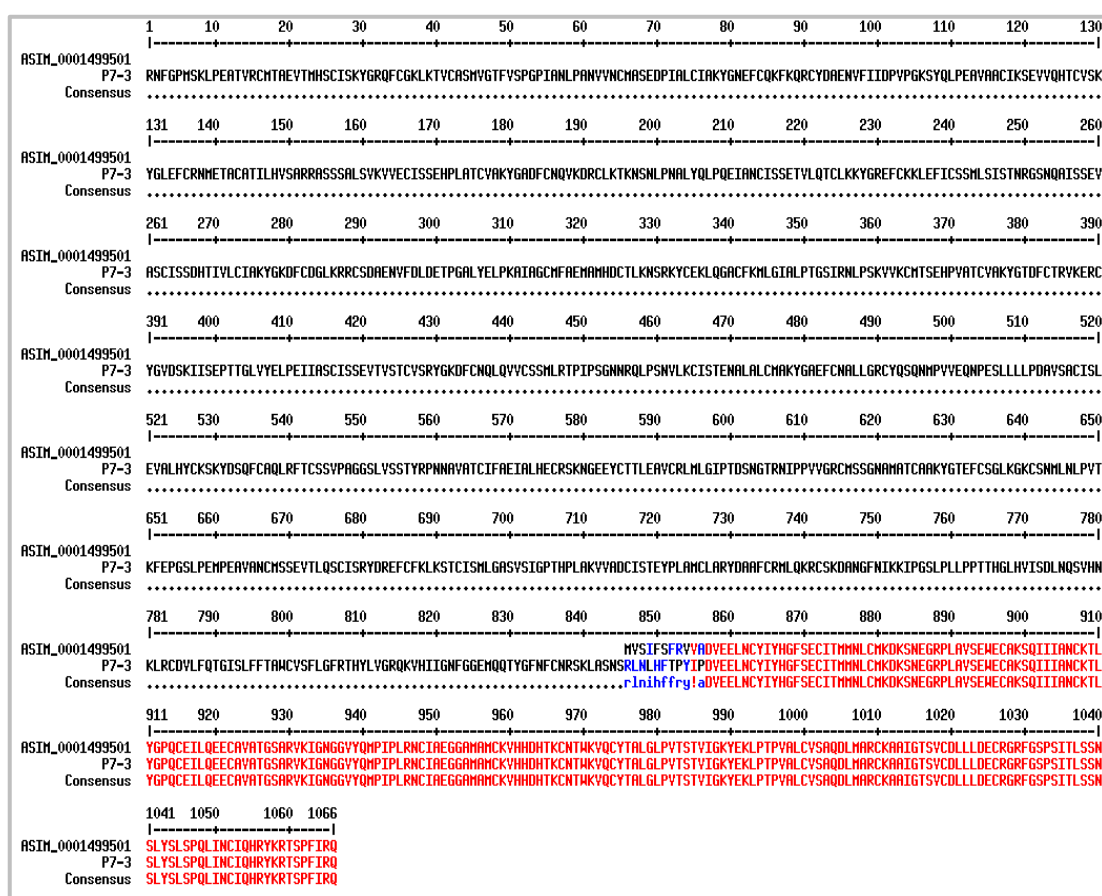


Figura 39. Alineamiento de la secuencia de P7-3 con la obtenida en la base de datos de Sanger

3.2 Alergeno Ani s 14

Durante la búsqueda de transcritos similares a la familia Ani s 7, se consiguió identificar un fragmento del gen (CL1Contig5881) de 655 aa, con alto contenido en cisteína y una estructura repetitiva con un dominio similar a los descritos para el alergen Anis s 7. Al realizar un *BLAST* se comprobó que la secuencia descrita por Kobayashi *et al.* (2015) como alergen Ani s 14 (LC027371) era parte del contig CL1Contig5881. Así mismo, se vio que la última porción del extremo carboxi coincidía con un fragmento UA3-H2 de este gen, previamente clonado en el laboratorio. Se intentó completar el gen mediante aproximaciones bioinformáticas. Los *contigs* resultantes, considerados para la obtención del gen, a través de la comparación con las bases de datos MH-E1 y MH-E2 se resumen en la tabla 26, así como la secuencia correspondiente a Ani s 14 obtenida de la base de datos de Baird *et al.* (2016).

Tabla 26. Secuencias correspondientes al gen que expresa el alergen principal Ani s 14, obtenidas de diferentes bases de datos

Se describen los *contigs* obtenidos de la base de datos MH-E1 con su respectiva estructura, formada por repeticiones regulares de aa separadas por cisteínas (C: cisteína; X: cualquier aa) y número de aa. Además, de las secuencias obtenidas de la base de datos MH-E2 y la publicada por Baird *et al.*, 2016, para este alergen.

E1	Estructura	aa	E2	Baird <i>et al.</i> , 2016
CL1Contig5881	CX ₉₋₁₃ CX ₈ CX ₆ CX ₁₅₋₂₆	655	CUFF.14490.1 CUFF.16013.1	Unigene13294_AS1A
CL1Contig5952	CX ₉₋₁₃ CX ₈ CX ₆ CX ₁₃₋₂₆	626		
CL1Contig5955	CX ₉₋₁₃ CX ₈ CX ₆ CX ₁₇₋₂₆	626		
CL1Contig1251	CX ₉₋₁₃ CX ₈ CX ₆ CX ₁₃₋₂₅	392		

Obtuvimos un gen de 4.494 nt que se traduce en 1.498 aa (164,78 kDa), sin péptido señal deducido; por lo se supone, falta un fragmento del extremo 5' de la secuencia, suponiendo por similitud con Ani s 7 que se trata de una proteína secretora. Presenta una estructura formada por repeticiones en tándem mantenida por 4 cisteínas conservadas, similar a la secuencia de los alergen Anis s 7 y Ani s 12. La secuencia de Ani s 14 está constituida por bloques de repeticiones con la siguiente cadencia:

$$[(CX_{15}CX_{13}CX_8CX_6)(CX_{13}CX_2CX_8CX_9)(CX_8CX_6CX_{16}CX_{13})[(CX_8CX_6CX_{26}CX_9)]_3(CX_8CX_6CX_{25}CX_{25})]_3 + [(CX_{15}CX_{13}CX_8CX_6)(CX_{13}CX_2CX_8CX_9)(CX_8CX_6CX_{16}CX_{13})[(CX_8CX_6CX_{26}CX_9)]_4(CX_8CX_6CX_{16}CX_{13})CX_8CX_{11}CX_{38}]$$



Figura 40. Secuencia correspondiente al gen que expresa el alérgeno Ani s 14

Las cisteínas conservadas se resaltan en azul

Al comparar las secuencias de Ani s 14 de las especies *A. simplex* s.s. (Unigene13294_AS1A) y *A. pegreffii* (Unigene53_AP1A), publicadas por Baird *et al.* (2016), se observaron 10 diferencias aminoacídicas entre ellas, señaladas en la tabla 27.

Tabla 27. Diferencias aminoacídicas en Ani s 14 de distintas especies de *A. simplex*

En la tabla se resumen los aminoácidos que difieren en Ani s 14 de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* y su posición en la secuencia.

Especie	Posición									
	96	231	391	543	1.022	1.093	1.295	1.502	1.539	1.559
<i>A. simplex</i> s.s.	E	M	M	R	H	K	A	V	S	G
<i>A. pegreffii</i>	A	I	T	L	Y	R	T	T	T	A

Con respecto a los epitopos de unión a anticuerpo IgE, similares a los descritos en Ani s 7, se encontraron 24 posibles epitopos en *A. simplex* s.s. y 25 en *A. pegreffii*, que de nuevo conservaban mayoritariamente la estructura CXXKYGX(E)(F)CXK (tabla 28).

Tabla 28. Posibles epitopos reconocidos por el anticuerpo UA3 encontrados en Ani s 14

En la tabla se exponen las secuencias de los epitopos de unión al anticuerpo UA3 encontrados en Ani s 14, indicando su posición en la secuencia. Los aa conservados de la secuencia central se resaltan en verde y los mantenidos al inicio y final del epitopo en rojo. Además, se indican las diferencias de aa entre ambas especies (subrayado).

Péptido	<i>A. simplex s.s.</i>			<i>A. pegreffii</i>			Posición
	aa iniciales	Secuencia central	aa finales	aa iniciales	Secuencia central	aa finales	
1	-	-	-	ARH	CLLQQLAAACSK	LTN	41-58
2	RAV	CLQKYGADFCHEH	LVV	RAV	CLQKYGADFCHEH	LVV	132-149
3	VAM	CYAKYGPARGMS	WMI	VAM	CYAKYGPARGMS	WMI	184-201
4	<u>MTV</u>	CKKKFGVKFCQR	FKV	<u>ITV</u>	CKKKFGVKFCQR	FKV	231-248
5	MAK	CFAYKKENCMK	WLK	MAK	CFAYKKENCMK	WLK	284-301
6	IYR	CVRKYDANFCYK	IIA	IYR	CVRKYDANFCYK	IIA	333-350
7	IVL	CRAKHGMEFCTK	LVR	IVL	CRAKHGTEFCTK	LVR	382-398
8	RTV	CIEKYGADYCVK	LIE	RTV	CIEKYGADYCVK	LIE	480-497
9	TAV	CYTKYGVPRCNA	WMR	TAV	CYTKYGVPLCNA	WMR	532-549
10	VTI	CKKKYGEQFCTK	LKA	VTI	CKKKYGEQFCTK	LKA	578-595
11	RET	CRDKYSKMDTDL	TAT	RET	CRDKYSKMDTDL	TAT	646-663
12	IYK	CVQKFDKFCYR	LIA	IYK	CVQKFDKFCYR	LIA	674-691
13	TIM	CMAKHGVEFCKK	LTA	TIM	CMAKHGVEFCKK	LTA	723-740
14	KVL	CMQKYGADFCMK	LIT	KVL	CMQKYGADFCMK	LIT	820-838
15	FLL	CKKKYGVFEFCTK	LKS	FLL	CKKKYGVFEFCTK	LKS	919-936
16	MAR	CYADYGAVKCME	WRE	MAR	CYADYGAVKCME	WRE	971-987
17	IYK	CVQKH ^u DANLCYK	MIA	IYK	CVQKYDANLCYK	MIA	1015-1032
18	IIL	CRGKHGVEFCDK	LVA	IIL	CRGKHGVEFCDK	LVA	1064-1081
19	KTV	CLQKYGA ^u EFCKN	LIL	KTV	CLQKYGA ^u EFCKN	LIL	1162-1179
20	IPM	CYAKYGEPRCIA	WMI	IPM	CYAKYGEPRCIA	WMI	1214-1231
21	ITI	CKKKYGD ^u EFCKV	MRT	ITI	CKKKYGD ^u EFCKV	MRT	1260-1277
22	MAK	CVVKFGQKCLE	WLK	MAK	CVVKFGQKCLE	WLK	1313-1330
23	QVK	CIAYKEQFCSS	MLS	QVK	CIAYKEQFCSS	MLS	1357-1374
24	VVQ	CRAKYSSESFCNR	LGA	VVQ	CRAKYSSESFCNR	LGA	1406-1423
25	ISQ	CIAQENIVAMCYA	SKC	ISQ	CIAQENIVAMCYA	SKC	1449-1467

De la tabla anterior se deduce que el epitopo está bastante conservado y altamente repetido en todas las secuencias, de manera similar a lo observado en Ani s 7. En la tabla 29, se muestran el número de repeticiones y cuáles de ellas conservan la secuencia propuesta para el reconocimiento por el AcM UA3.

Tabla 29. Repeticiones del epitopo de unión al AcM UA3 en Ani s 14

En la tabla se resumen el número de repeticiones del epitopo, así como el número de epitopos más conservados obtenidos en la tabla C-12.

	Nº epitopos repetido	Nº epitopos necesarios para el reconocimiento
<i>A. simplex s.s.</i>	24	6
<i>A. pegreffii</i>	25	7

DISCUSIÓN

1. Búsqueda de alérgenos de *A. simplex* s.l. mediante análisis “in silico”

Los procesos alérgicos asociados a la infección *A. simplex* s.l. provocan en nuestro país una demanda clínica constante. Si bien, en los últimos años el diagnóstico y conocimiento de estas entidades clínicas ha aumentado considerablemente, sería muy útil la búsqueda de diferentes alérgenos para (I) fines diagnósticos (II) caracterización de respuesta clínica según sintomatología (III) desarrollo de diagnósticos resueltos por componentes (CDR).

En el momento de iniciar los trabajos de la presente memoria, uno de los mayores hándicaps que existía era la ausencia de información de los genes de la L3 del parásito *A. simplex* s.l., de hecho dentro de la familia Anisakidae solamente se habían publicado los genes de unas pocas proteínas. La mayor parte de la información publicada se correspondía a genes mitocondriales y ribosomales caracterizados para estudios taxonómicos y aún no existía ningún genoma o transcriptoma del parásito publicado.

Con estos antecedentes, nos propusimos sintetizar, secuenciar, ensamblar y anotar el transcriptoma de la L3 de *A. simplex* s.l. con el fin de generar una base de datos, que permitiese su utilización como herramienta para el rastreo de genes de interés parasitario; y en el caso concreto del presente trabajo desarrollar su objetivo principal, predecir y caracterizar molecularmente nuevos alérgenos putativos del parásito.

Debido a la ausencia de genomas de referencia, se decidió realizar un ensamblado “de novo” de las lecturas obtenidas utilizando el programa Oases 0.2.1 (Schulz *et al.*, 2012). Tras el ensamblado y anotación funcional y estructural del transcriptoma se obtuvieron un total de 22.760 *contigs* correspondientes a regiones codificantes, de los cuales 1.520 *contigs* (6,68%) se predijeron como proteínas de ES (clásicas y no clásicas), porcentaje inferior al descrito (15,09%) para las proteínas secretoras de la L3 de *Strongyloides stercoralis* (Marcilla *et al.*, 2012). Hay que tener en cuenta que estos investigadores consiguen ese porcentaje haciendo una predicción adicional, en la que comparan (mediante *BLAST*) los *contigs* que habían sido excluidos por bioinformática como posibles proteínas de ES con una base de datos que contenía información de proteínas de ES de helmintos parásitos verificadas experimentalmente. Las proteínas así predichas (10,97%) se suman a las determinadas bioinformáticamente (4,12%), porcentaje este último menor que el predicho para las proteínas de ES de *A. simplex* s.l. en la presente memoria (6,68%). Es de suponer que al igual que ocurría para *S. stercoralis*, algunas de las proteínas de *A. simplex* s.l. excluidas como ES, sí lo sean. Este podría ser el caso de algunos genes cuyas secuencias no estén completas en su extremo amino y por tanto no se pueda caracterizar su péptido señal, aun teniéndolo en la naturaleza. Es por ello, que probablemente el porcentaje real de proteínas de ES de la L3 de *A. simplex* s.l. sea mayor que el predicho en la presente memoria.

Sin embargo, el poseer las secuencias correspondientes a estas proteínas putativas ES de *A. simplex* s.l. nos permitía utilizar esta información para la búsqueda dirigida de alérgenos del

parásito. Se sabe que los antígenos ES son los principales responsables de las reacciones alérgicas desencadenadas por *A. simplex* s.l. en humanos (Kim *et al.*, 2005) por lo que se decidió filtrar los candidatos a alergen putativos (556 *contigs*) obtenidos tras la comparación de los *contigs* correspondientes a regiones codificantes, determinadas en la anotación estructural, con las secuencias de alergen previamente descritos en tres bases de datos de alergen (*Allermatch*, *FARRP*, y *Allergome*) en función de su presencia y homología con las proteínas putativas ES de *A. simplex* s.l. De este modo se restringieron de 556 *contigs* a 54 *contigs*.

De modo paralelo a la realización del trabajo mencionado, en el año 2014, el Instituto Sanger, en colaboración con *WormBase* y como parte de la iniciativa de caracterizar 50 genomas de helmintos (*Helminth Genomes Consortium*), hizo pública la base de datos del genoma de la L3 de *A. simplex* s.l. (Howe *et al.*, 2016-b). La disponibilidad de esta herramienta nos llevó a desarrollar un segundo ensamblaje del transcriptoma MH “de novo” guiado por referencia (E2) para completar la información obtenida por el ensamblaje “de novo” (E1) previamente realizado. Los resultados de la combinación de ambos ensamblados facilitaron la identificación de las secuencias de los 54 *contigs* predichos como alergen putativos de *A. simplex* s.l. Así se comprobó que algunos de ellos codificaban para una misma proteína restringiéndose, finalmente, la predicción a 24 alergen putativos. El análisis de las características de estas proteínas indicaba que 12 serían enzimas, 3 inhibidores de proteasas, 2 calmodulinas, 2 proteínas relacionadas con D7, 2 proteínas de choque térmico, 2 proteínas de veneno, 1 poliproteína alérgica de nematodos.

Se sabe que en, términos generales, la alergenidad no depende tanto de la similitud con las proteínas de otra especie (parásito en nuestro caso) sino también de la diferencia con las proteínas humanas. Así, Santiago *et al.* (2012), al comparar las secuencias de 499 alergen con los proteomas predichos de cuatro helmintos, encontraron que las moléculas con mayor similitud fueron las menos alérgicas cuando ellas mostraban equivalentes en humanos. Con esta premisa se clasificaron los 24 alergen predichos utilizando como criterio que a mayor identidad (>60%) con nematodos y menor con humanos (<30%) (Figura 11). Los cuatro mejores candidatos seleccionados AT-1, AT-2, AT-3 y AT-4 pertenecían a las familias de alergen (*ALLFam*) tioredoxina (AF023), dominio tipo mano EF (AF007), inhibidor de serín proteasas, serpina (AF018), e inhibidor tipo tripsina con dominios ricos en cisteínas (AF027) respectivamente.

AT-1 es una disulfuro-isomerasa (PDI) tipo TMX3, perteneciente a la superfamilia de las tioredoxinas. AT-1 contiene el clásico dominio TRX, con un motivo redox activo (CXXC), en el extremo amino (Kozlov *et al.*, 2010). El gen de esta proteína también se ha descrito en los genomas de *T. canis* (76%, KHN72778) y en filarias: *L. loa* (63%, EJD74647), *B. malayi* (62%, CDQ02307) y *W. bancrofti* (62%, EJW80151). Los ortólogos de AT-1 en nematodos están en las bases de datos como parte de la descripción de sus respectivos genomas, sin que ninguna de las moléculas se haya estudiado de manera individual, o se les haya asignado un papel concreto en la biología del parásito. Presentan un dominio TRX similar a los de otras tioredoxinas definidas en eucariotas y

en otros parásitos; pero el motivo redox, en vez de ser el universal CGHC, es CAHC para todos los nematodos.

AT-1, y sus ortólogos en nematodos, no presentan un dominio transmembrana; además, difieren en la secuencia consenso de unión al retículo endoplásmico (KDEL) conservada y presente en el extremo carboxilo terminal de otras PDI (proteína disulfuro isomerasa). En el caso de AT-1, y sus ortólogos en nematodos, la secuencia es Q(H)KAD en el caso de ascaridos (*A. simplex* s.s. y *T. canis*) y QKEE para filarias (*L. loa* y *B. malayi*).

Respecto a la potencial alergenicidad de AT-1, las tioredoxinas componen una importante familia de alergenos (código *AllFam*: AF007) cuyo alergeno representativo es Asp f 28 (tioredoxina de *Aspergillus fumigatus*). AT-1 exhibe similitud con 9 alergenos, todos ellos clasificados funcionalmente como tioredoxinas, con las mayores identidades frente a tioredoxinas de hongos: Mala s 13 (1.8e-08, *Malassezia sympodialis*), Asp f 28 (4.1e-07, *A. fumigatus*), Fus c 2 (3.2e-06, *Fusarium culmorum*), Cop c 2 (5.5e-06, *Coprinus comatus*), Alt a 4 (1.1e-05, *Alternaria alternata*) y Asp f 29 (1.5e-05, *A. fumigatus*). Se sabe que la reactividad cruzada entre alergenos se da frecuentemente entre proteínas pertenecientes a la misma familia (Breiteneder y Mills, 2006; Schein *et al.*, 2007). Por ejemplo, los alergenos implicados en alergias alimentarias a cerezas (Pru av 3), albaricoque (Pru Ar 3) y melocotón (Pru p 3), son proteínas de transferencia de lípidos (LTP) y se cree que un homólogo estructural presente en el polen del árbol plano (Pla a 3) es el alergeno responsable de reactividad cruzada entre polínicos y alérgicos a estos alimentos en población mediterránea (Lauer *et al.*, 2007). Respecto a las PDI de hongos, en *A. fumigatus* se ha clonado un alergeno (AF363787), correspondiente a una PDI, que es reconocido por anticuerpos (IgG e IgE) de pacientes aquejados de aspergilosis brocopulmonar alérgica (ABA), lo que indica la presencia de epitopos antigénicos y alergénicos. Además, mediante estudios de plegamiento, se le asignan una actividad chaperona. Los autores postulan que el papel de estas PDI en el procesamiento de las ribonucleasas de *A. fumigatus* podría ser importante, debido a la implicación que estas ribonucleasas tienen en varias de las formas invasivas de aspergilosis sistémicas y alérgicas (Nigam *et al.*, 2001).

De los 24 alergenos predichos, hay otras dos proteínas, además de AT-1, clasificadas funcionalmente como disulfuro-isomerasas AT-13 y AT-19. Aunque todas son PDI, AT-1 es una PDI tipo TMX3 con un solo dominio redox activo mientras que AT-13 es una PDI “clásica” con dos dominios TRX catalíticos en los extremos y dos no catalíticos en el interior del gen (abb’a’). Finalmente AT-19 presenta dos dominios TRX catalíticos seguidos de un dominio no catalítico (aa’b’).

Como en el caso de AT-1, al hacer una búsqueda en las bases de datos nos encontramos con ortólogos en nematodos, tanto de AT-13: *T. canis* (84%, KHN71241), *A. suum* (81%, CAK18211), *Ancylostoma duodenale* (76%, KIH46995) etc., como de AT-19: *T. canis* (KHN88358), *L. loa* (EFO25483), *B. malayi* (CRZ24268), etc. Como para los ortólogos de AT-1, estas proteínas están en

las bases de datos como parte de la descripción de sus respectivos genomas, sin que ninguna de las moléculas se haya caracterizado experimentalmente.

En parásitos, las PDI se han estudiado y caracterizado principalmente en protozoos *Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolytica*, *Leishmania infantum*, *Leishmania brasiliensis*, *Leishmania major*, *Leishmania amazonensis*, etc. La mayoría de las PDI analizadas mantienen la estructura clásica (abb'a') y el motivo general CGHC, aunque en algunos parásitos (*L. infantum* y *L. amazonensis*) se han descrito isoformas con la variante CRYC (Ben-Achour *et al.*, 2002; Florent *et al.*, 2000; Hong y Soong, 2008; Mares *et al.*, 2009).

Al igual que ocurre en *A. simplex* s.l. la presencia de PDI con diferentes estructuras (AT-1, AT13- y AT-19) ha sido reportada en otros parásitos, como *P. falciparum*, donde se han descrito 5 PDI (PfPDI-8, PfPDI-9, PfPDI-11 and PfPDI-14), de las cuales PfPDI-8 presenta el prototipo más similar a las PDI clásicas con la estructura abb'a' (Mahajan *et al.*, 2006).

Respecto al papel que puedan ejercer estas PDI en nematodos, se desconoce. En protozoos intracelulares, como *Leishmania* spp., se sabe que su expresión se correlaciona con la patogenicidad de las cepas parasitarias (Ben-Achour *et al.*, 2002). En el protozoo *Toxoplasma gondii* se han identificado PDI en las lágrimas de humanos, sugiriéndose una localización extracelular y un papel en la adhesión a las células de hospedador durante la fase de infección, basándose en la presencia de IgA anti-PDI capaz de unirse a la superficie del parásito (Meek *et al.*, 2002).

Mencionar también que AT-13 porta en su secuencia (posición 252-260) uno de los péptidos (SHNLLFISK) identificados mediante análisis proteómico por espectrometría de masas por Fæste *et al.* (2014) y que los autores comprueban que se conservan en la secuencia de una proteína de *A. suum* (CAK1821), con función teórica de isomerasa; de modo que describen la existencia de un alérgeno potencial en *A. simplex* s.l., con esta función y cuya secuencia no pueden identificar (por no haber en el momento de la publicación información accesible para ello en las bases de datos). Dicho alérgeno se correspondería con AT-13. Fæste *et al.* (2014) identificaron potenciales alérgenos de *A. simplex* por comparación de proteínas del parásito con alérgenos definidos en la base de datos AllFam y con alérgenos conocidos de nematodos, insectos o crustáceos. El experimento fue realizado con extracto crudo de larvas de *A. simplex* s.l. y 2 grupos de pacientes diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA) y sensibilización frente a *A. simplex* s.l. respectivamente. Los autores comparan los resultados de la identificación de los péptidos (producidos tras la digestión trípica de 16 bandas del extracto crudo larvario separado mediante SDS-PAGE), con los perfiles de reconocimiento individuales obtenidos mediante *western blotting* con los sueros de los dos grupos antes indicados. Los autores correlacionan la señal de unión a IgE más intensa (reconocida por todos los pacientes a 56 kDa) con la disulfuro isomerasa putativa. AT-13 no solo porta el péptido identificado sino que posee un peso molecular (54,67 kDa) compatible

con el definido en los inmunoblots. Se postula que AT-3 es el alérgeno inmunodominante propuesto por Fæste *et al.* (2014).

Después del alérgeno AT-1, los alérgenos AT-2, AT-3 y AT-4 fueron clasificados como mejores candidatos utilizando como criterio que presentasen mayor identidad (>60%) con nematodos y menor con humanos (<30%). Tanto AT-3 como AT-4 se corresponden con inhibidores de proteasas, en concreto inhibidores de serin proteasas.

AT-3 es una serpina que pertenece a la familia de inhibidores de serin proteasas clásica. Presenta un Pm de 44,8 kDa y similitud con serpinas de otros nematodos, *A. suum* (59%, ERG78895; 50%, ERG82472), *T. canis* (60%, KHN77043; 53%, KHN80292; 43%, KHN74042; 48% KHN72249.1) y 45% de similitud con la proteína ANISERP de *A. simplex* (CBX25525.1); esta última identificada anteriormente en el laboratorio. AT-3 presenta el dominio conservado de serpinas y por comparación con el RCL (residuos del bucle catalítico) descrito en ANISERP (Valdivieso *et al.*, 2015) se asigna este a los residuos 357-EKGTEAAAATGMQMTLLSAP-376.

En nematodos, las serpinas no sólo interaccionan con proteasas endógenas del mismo parásito, regulando su actividad, sino que además pueden tener funciones relacionadas con la interacción con el hospedador, actuando en la defensa frente a digestión por parte de sus proteasas, evasión de la respuesta inmune así como actuar como inmunomoduladores (Zang *et al.*, 1999; Zang y Maizels, 2001; Molehin *et al.*, 2014). Durante el proceso de invasión de *A. simplex* en la mucosa digestiva del hospedador, el parásito libera productos de ES que le ayudan en este proceso. Morris y Sakanary (1994) purificaron una serpina de *A. simplex* s.l. de 21 kDa capaz de inhibir la tripsina bovina y la elastasa humana leucocitaria y al que asignan un posible papel regulador de proteasas internas, sin eliminar la posibilidad de que actúe inhibiendo las enzimas del hospedador mientras el parásito penetra en el tejido digestivo. Desconocemos cual es el papel biológico del inhibidor AT-3 en *A. simplex*.

Respecto al potencial alérgico de AT-3, los inhibidores de serin proteasas, serpinas, conforman otra familia de alérgenos (código AllFam: AF018) aunque con menor número de representantes. Destacar que 2 de los 14 alérgenos ya caracterizados en *A. simplex* s.l. (Ani s 1 y Ani s 6) son inhibidores de serin proteasas. Ani s 1 es una serpina con un dominio kunitz típico y se considera un alérgeno principal del parásito mientras que Ani s 6 es una serpina similar a otros inhibidores tanto de quimotripsina como de tripsina y no se considera un alérgeno principal del parásito (Moneo *et al.*, 2000; Shimakura *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2007-a). Aunque AT-3 es una molécula potencialmente alérgica, se necesitaría confirmarlo experimentalmente.

AT-4 es también un inhibidor de serin proteasas pero, a diferencia de AT-3, no presenta la estructura clásica de las serpinas de los mamíferos. En nematodos se han descrito dos clases de inhibidores de serin proteasas, serpinas clásicas similares a sus homónimos humanos, como es el caso de AT-3 y esmapinas que son serin proteasas de menor tamaño, de hecho el nombre *smapin*

en inglés es un acrónimo de *small serine proteinase inhibitors*. Todos los miembros de esta familia tienen menos de 100 residuos aminoácidos y mantienen una estructura característica condicionada por la presencia de 10 cisteínas en posiciones conservadas que forman 5 enlaces disulfuro. Mediante estudios estructurales se ha determinado la localización de esos puentes disulfuro, dos de los cuales se posicionan a ambos lados del bucle catalítico (Zang y Maizels, 2001). AT-4 con 80 residuos aminoácidos y las 10 cisteínas universales, mantiene esta estructura y se puede clasificar como esmapina.

El papel funcional de las esmapinas, descritas en nematodos, se relaciona con su naturaleza, mecanismos de invasión y necesidades concretas según el tipo de parásito. Así en *A. suum*, nematodo tisular, las esmapinas protegen al parásito de la degradación proteolítica de las enzimas del hospedador. Mientras que en uncinarias, con una función digestiva de tipo hemoglobinolítica, son responsables de su capacidad anticoagulante. Así se han descrito esmapinas que inhiben el factor de la coagulación Xa (AcAP6), los factores Xa y XIa (AcAP5) o el complejo formado por los factores VIIa–factor tisular (AcAPc2) (Cappello *et al.*, 1995; Stanssens *et al.*, 1996; Zang y Maizels, 2001; Rios-Steiner *et al.*, 2007). En *A. simplex* s.l. se han reportado tres esmapinas de 76 aminoácidos, dos de ellas (AX-SPI-1 y AX-SPI-2) inhiben la elastasa y una tercera AX-SPI-3 de la que se desconoce cuál es su diana (Nguyen *et al.*, 1999).

AT-4 presenta un 65% de similitud con el alérgeno e inhibidor de proteasa de *A. simplex*, Ani s 6 (BAF43535.1). Como se indicó previamente, el alérgeno Ani s 6 no se considera un alérgeno principal, debido a que es reconocido solo por el 18% de los pacientes con alergia a *A. simplex* s.l. y fue el primer inhibidor de proteasa identificado experimentalmente como un alérgeno en nematodos; presenta actividad de inhibición de la α -quimotripsina pero no de la tripsina y un dominio rico en cisteínas (Kobayashi *et al.*, 2007-a). Ani s 6 tiene 84 aminoácidos y los diez residuos canónicos de la familia de las esmapinas.

Otro de los alérgenos predichos en el presente trabajo y que también pertenece a la familia de inhibidores de tripsina (TIL) con dominio rico en cisteínas es AT-17. Esta proteína, con 146 residuos aminoácidos, contiene dos dominios TIL, a diferencia de las esmapinas que solo contienen uno. Exhibe similitud baja con proteínas con dominios TIL de otros nematodos (como *T. canis*, 50%, KHN75744) y artrópodos (como el escarabajo rojo de la harina, *Tribolium castaneum*, 40%, XP_967476) y mayor con el alérgeno Ani s 6 (75%, BAF43535).

Respecto al papel biológico que AT-17 pueda ejercer en *A. simplex* s.l. se desconoce. En *A. duodenale*, se ha descrito un inhibidor de serin proteasa con 2 dominios TIL capaces de inhibir la elastasa neutrofílica humana y la tripsina pancreática bovina; este inhibidor se localiza en el esófago, intestino y cutícula del parásito adulto, se le ha asignado un papel importante en su supervivencia mediante la inhibición de enzimas digestivas y elastasa neutrofílica del hospedador (Jin *et al.*, 2011).

Respecto al potencial alergénico de este grupo de proteínas, existen evidencias de inhibidores de serin proteasa con dominio TIL con capacidad alergénica, como Api m 6. Este alérgeno es, de hecho, el representante de la familia de alérgenos de inhibidores tipo tripsina con dominios ricos en cisteína (código AllFam: AF027). Api m 6 es componente minoritario del veneno de la abeja doméstica (*Apis mellifera*), que si bien no se considera un alérgeno principal, exhibe capacidad potencial sensibilizante en algunos pacientes con alergia al veneno de abeja (Michel *et al.*, 2012).

El último alérgeno de los 4 seleccionados como “alérgenos más probables” se corresponde con una calmodulina (AT-2). AT-2 pertenece a la superfamilia de proteínas con dominio funcional de mano EF, que participan como sensores y moduladores de la señal de calcio. Los dominios de mano EF están formados por dos hélices α cortas (E y F), unidas por un bucle donde se incorpora el calcio. La unión con el calcio provoca cambios conformacionales en el dominio de mano EF, permitiendo la activación o inhibición de la proteína diana (Ikura *et al.*, 1996). Es una de las familias de alérgenos (código AllFam: AF007) que engloba mayor número de componentes. AT-2 muestra una identidad del 64% con la proteína 5, similar a la calmodulina, descrita en *T. canis* (KHN72938.1) y 59% con la proteína con dominio de mano EF de *A. suum* (ERG85007.1).

En *A. simplex* se ha identificado un alérgeno perteneciente a esta superfamilia de proteínas, Ani s troponina. Este alérgeno similar a las troponinas C de otros nematodos (*O. volvulus*, 99% KHN83883.1; 2 *A. suum*, 99% ERG82114.1, etc.,) presenta también identidad con el alérgeno (troponina C) de la cucaracha rubia (Bla g 6, 5.8e-25 *Blattella germanica*) y de la cucaracha americana (Per a 6, 2.1e-25, *Periplaneta americana*). Ani s troponina no se considera un alérgeno principal ya que solamente es capaz de reaccionar con el 20% de los pacientes con alergia por *Anisakis* (Arrieta *et al.*, 2000; Hindley *et al.*, 2006). En trematodos se encuentran otros dos ejemplos de alérgenos parasitarios con dominio de mano EF. Así en *Schistosoma mansoni*, se han identificado proteínas de esta familia similares a alérgenos de tegumento y expresadas durante el desarrollo del parásito (Sm TAL1) (Hoffmann *et al.*, 1997; Fitzsimmons *et al.*, 2012). En *Fasciola gigantica* se ha descrito una proteína de unión al calcio (FgCaBP) cuyo dominio de mano EF es capaz de inducir fuertes respuestas de tipo IgG e IgE en ratones inmunizados (Subpipattana *et al.*, 2012).

Otro alérgeno predicho y perteneciente a esta familia es AT-7. Esta proteína exhibe similitud con la calmodulina 2 de *A. suum* (77%, ERG81872 y en menor medida con calmodulinas de braquiópodos (*Lingula anatina*, 52%, XP_013400665) y protozoos (*Trypanosoma brucei gambiense* DAL972, 50%, XP_011780593)

Seis de los 24 alérgenos predichos se corresponden con proteasas: AT-9 (catepsina B), AT-11 (catepsina L) AT-12 (catepsina Z), AT-14 y AT-20 (catepsinas D), y AT-24 (serin carboxipeptidasa). Se sabe que la mayor parte de los alérgenos carecen de actividad proteolítica;

sin embargo, existe un grupo pequeño de ellos con dicha actividad, que les permitiría la penetración de las barreras de la mucosa (Herbet *et al.*, 1995; Fitzsimmons *et al.*, 2014). Muchos helmintos parásitos tisulares dependen de la producción de proteasas para lograr la migración exitosa a través de los tejidos; en el caso de *A. simplex* el parásito libera proteasas que desempeñan un papel fundamental en la digestión de los tejidos del hospedador ya que son capaces de degradar *in vitro* varios componentes de la matriz extracelular de la pared gastrointestinal, como fibronectina, laminina o colágeno (Sakanari y Mckerrow, 1990). Falcone *et al.* (2004) plantean que las proteasas liberadas por los helmintos tisulares pueden ser un factor subyacente a la alergenicidad intrínseca de algunos de estos parásitos.

Tres de los seis alérgenos predichos como proteasas (AT-9, AT-11 y AT-12) son cistein proteasas. Las tres pertenecen a la familia de la papaína C1A. AT-9 es a una cistein proteasa similar a la catepsina B, mientras que AT-11 tiene un dominio similar a la cistatina y otro dominio inhibidor de la familia I29, presentes en las catepsinas L, mientras que AT-12 es una catepsina Z.

En parásitos, se han descritos diversas catepsinas que juegan un papel importante en la migración larvaria, muda y adquisición de nutrientes. A diferencia de lo que ocurre en vertebrados donde los procesos digestivos se llevan a cabo por reacciones secuenciales de múltiples proteasas de diferentes clases, fundamentalmente serin proteasas, en los invertebrados este papel principal en el proceso secuencial recae en las cistein y aspartil proteasas.

Probablemente, en los helmintos que mejor estén caracterizadas las cistein proteasas sean en los trematodos. Así en *S. mansoni*, se ha visto que la catepsina D juega un papel fundamental en la degradación de la hemoglobina. La catepsina D fracciona la hemoglobina en dos péptidos de 6 y 16 kDa, que son posteriormente degradados por catepsinas B y L con menor participación de esta última (Delcroix *et al.*, 2006). En cambio en *Fasciola hepatica* ocurre lo contrario, son las catepsinas L las cistein proteasas más abundantes implicadas en la digestión del parásito e invasión tisular (Dalton *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2011; Corvo *et al.*, 2013).

En nematodos, como es el caso de *Angiostrongylus cantonensis*, se considera que la catepsina B está implicada en procesos metabólicos del parásito, específicamente en la degradación de hemoglobina del hospedador, así como también en procesos de invasión celular y tisular mediante la degradación de componentes del tejido conectivo como la fibronectina y laminina (Cheng *et al.*, 2012; Long *et al.*, 2015). En *Gnathostoma spinigerum* se ha descrito una catepsina L expresada en células intestinales a la que se le asigna un posible papel en la degradación de proteínas del hospedador que son ingeridas por la larva 3 del parásito (Kongkerd *et al.*, 2008). En anisakidos, mediante ensayos *in vitro* con *Hysterothylacium aduncum* se ha verificado la existencia de catepsinas L y B. La caracterización bioquímica y los ensayos de localización indican que las catepsinas L probablemente estén implicadas en la digestión de nutrientes y las catepsinas B en los procesos de muda (Malagón *et al.*, 2010). Así mismo, en *O.*

volvulus y *T. canis*, se han descrito catepsinas Z implicadas en el proceso de muda de larva 3 a larva 4 (Lustigman *et al.*, 1996; Falcone *et al.*, 2000; Lustigman *et al.*, 2004).

En cuanto a su potencial alergénico, los alergenitos predichos AT-9, AT-11 y AT-12 se engloban en la familia “cistein proteasas parecidas a papaína” (código AllFam AF030), cuyo alergenito representativo es Der p 1 (cistein proteasa de *D. pteronyssinus*). La actividad proteolítica es una propiedad bioquímica de algunos alergenitos, como el mencionado Der p 1 o la aspartil proteasa de la cucaracha alemana (*B. germanica*) Bla g 2, responsables del aumento del asma y las condiciones atópicas en todo el mundo. En las infecciones crónicas por helmintos las respuestas antiinflamatorias (con IL-10 y TGF- β) son en gran parte responsables de controlar el daño mediado inmunológicamente al huésped, que es iniciado por las proteasas secretadas por el parásito; en este caso protegerían contra el daño inflamatorio similar al inducido por los alergenitos. Lo contrario podría ocurrir en infecciones agudas como el parasitismo accidental por *A. simplex* s.l., donde las proteasas secretadas por helmintos podrían sensibilizar a los individuos (Donnelly *et al.*, 2006).

Dos de los siete alergenitos predichos con actividad proteasa son aspartil proteasas (AT-14 y AT-20). Ambas pertenecen a la familia de las proteasas A1 (clan AA). AT-14 es una aspartil proteasa, de *A. simplex* s.l., ya descrita en las bases de datos (ACY38599, 99% de similitud), aunque sin caracterizar funcionalmente. AT-14 presenta identidad con otras catepsinas D de nematodos parásitos como *T. canis* (87%, KHN85065), *A. duodenale* (41%, KIH68755), *Necator americanus* (76% CAC00543.1). AT-20 es una aspartil proteasa de *A. simplex*, diferente a la anterior, que exhibe similitud con otras aspartil proteasas de nematodos parásitos como *T. canis* (ASP-6, 42%, KHN74210.1), *A. duodenale* (41%, KIH68755), *N. americanus* (*necepsin* I, 37% CAC00542.1).

En otros nematodos parásitos sí se han caracterizado funcionalmente algunas catepsinas D. Un ejemplo de ello son las proteasas expresadas en larvas 3 y adultos de *Ancylostoma caninum* (Ac-APR-1 o Acasp) y *N. americanus* (Na-APR-1) implicadas en el proceso de invasión del parásito mediante proteólisis del tejido conectivo, así como en la digestión de proteínas del suero humano (albúmina y fibrinógeno) para su nutrición (Williamson *et al.*, 2003-a). Estas proteasas se expresan tanto en las glándulas excretoras y cefálicas como en la gastrodermis del intestino parásito (Williamson *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2009).

AT-20 pertenece un grupo de aspartil proteasas descritas en nematodos que se denominan nemepsinas o necepsinas (*nematode pepsin-like enzymes*); similares a las plasmepsinas reportadas en *P. falciparum* (Goldberg *et al.*, 1991; Francis *et al.*, 1994). En el nematodo parásito *N. americanus* se han definido dos representantes, Mername-AA046 peptidasa y Na-APR-2. Na-APR-2 actúa degradando la hemoglobina, el fibrinógeno y el colágeno y juega un papel importante en la nutrición e invasión del parásito (Williamson *et al.*, 2003-b).

Los dos últimos miembros del grupo de alergenitos predichos con actividad proteasa serían AT-23 y AT-24. Estos alergenitos pertenecen al grupo C de las serin carboxipeptidasas, dentro

de la familia de serin proteasas S10. No se consiguió completar la secuencia de la proteína AT-23, que no estaba presente en ninguna de las bases de datos públicas, por lo que se descartó este candidato. AT-24 muestra homología con genes teóricos de carboxipeptidasas de otros nematodos como *T. canis* (55%, KHN74262), *Anylostoma ceylanicum* (47%, EYB87430). Desconocemos el papel biológico que AT-23 pueda ejercer en *A. simplex* s.l. así como su potencial alergénico. La familia de alérgenos “carboxil esterasas” (código AllFam AF140) tiene un número escaso de componentes, siendo el más representativo el alérgeno de la abeja doméstica (*A. mellifera*) Api m 8.

Los restantes alérgenos predichos serían proteínas secretoras ricas en cisteínas o SCP (AT-10 y AT-16), fosfatasa ácida (AT-5 y AT-8), proteínas de choque térmico (AT-6 y AT-18), proteínas D7 (AT-21 y AT-22) y poliproteína alérgica de nematodos NPA (AT-15).

AT-10 y AT-16 presentan un dominio SCP-like y pertenecen a la familia de las proteínas secretoras ricas en cisteínas, SCP, ya mencionadas previamente. AT-10 y AT-16 son isoformas que sólo difieren en dos residuos aminoácidos en posiciones 2 (P/S) y 129 (Q/R). Varios nematodos parásitos importantes expresan miembros de esta familia de genes que se ha denominado de diversas formas, bien como homólogo del antígeno alérgico de veneno (VAH) o como proteína secretada de *Ancylostoma* spp. (ASP) (Murray *et al.*, 2001; Asojo *et al.*, 2005). AT-10 y AT-16 muestran identidad con genes de dicha familia de *T. canis* y otros nematodos, que no han sido caracterizados pero han sido anotados a través de proyectos de secuenciación como, el VAH de *T. canis* (42%, KHN88210), ASP de *T. canis* (44%, KHN73598), ASP de *T. canis* (43%, KHN83069), alérgeno 3 de veneno de *A. suum* (41%, ERG80545), alérgeno 5 de veneno de *A. suum* (38%, ERG86032), etc.

La molécula de nematodos parásitos más estudiada de esta familia es, probablemente, Na-ASP-2 de *N. americanus* debido tanto a sus propiedades vacunales demostradas, como a los hechos acontecidos tras su administración por primera vez en zona endémica. La vacuna con Na-ASP-2 recombinante había demostrado tanto su eficacia en animales de laboratorio, donde proporcionó una protección significativa contra infecciones experimentales, como su buena tolerancia al probarse en adultos no expuestos a uncinarias en los que indujo una respuesta inmune prolongada (Goud *et al.*, 2005; Fujiwara *et al.*, 2005; Bethony *et al.*, 2008).

Sin embargo al aplicarla en zona endémica en varios voluntarios adultos brasileños sanos previamente infectados con *N. americanus*, la vacunación con una sola dosis de Na-ASP-2 dio lugar a reacciones urticariales generalizadas que obligaron a suspender su aplicación. Estas reacciones se asociaron con IgE preexistente específica de Na-ASP-2, probablemente inducida por una infección previa por ancilostómidos. Se cartografió la molécula y se localizaron los epitopos que se reconocen única o conjuntamente por anticuerpos IgG e IgE, mediante ELISA con péptidos solapantes de 13 aminoácidos y utilizándose los sueros de los individuos del ensayo vacunal. Se identificaron un total de 14 epitopos: cuatro que unían IgE, seis IgG y cinco de unión a IgE, e IgG. El más reconocido era el W135, que fue reconocido por las IgE de 8 individuos y las IgG de otros 8.

Los cuatro epitopos que unían IgE fueron S149, F123 M151 y A161, siendo S149 el más reactivo con todos los individuos (Diemert *et al.*, 2012).

Al comparar las propiedades fisicoquímicas y similitud del péptido W135, y de los otros cuatro destacados, con el alérgeno AT-10 mediante el índice PD, se pudo predecir cuatro posibles epitopos en las posiciones 148-160, 160-172, 182-190 y 192-204. Podemos concluir pues, que la molécula AT-10 tiene un alto potencial alérgénico con tres posibles epitopos putativos de unión a IgE y un cuarto mixto. Lo mismo ocurriría con la isoforma AT-16, ya que los dos cambios observados no se incluyen en los epitopos predichos.

Estos datos nos llevaron a buscar en el transcriptoma proteínas análogas a AT-10 (*Ani-VAL1*); se encontró una proteína de la misma familia a la que denominamos *Ani-VAL2* y que presenta características similares a *Ani-VAL1*.

AT-5 y AT-8 corresponden a fosfatasa ácida que pertenecen a la rama 2 (fosfatasa ácida histidina) de la superfamilia de las fosfatasas histidina y son hidrolasas teóricas con actividad de esterasas. Presentan el motivo RHGXRP dentro del dominio activo de la proteína (Van Etten *et al.*, 1991; Lindqvist *et al.*, 1993).

Respecto su papel biológico, en *A. simplex*, se ha comprobado la actividad de diferentes hidrolasas, como la mencionada fosfatasa ácida, detectándose mayor actividad en larvas 3 (tercer estadio) que en las de cuarto estadio; la alta expresión de hidrolasas (esterasas, péptidasas y glucosilasas) sugiere su vinculación a procesos de penetración en tejidos del hospedador por la larva (Lopieńska-Biernat *et al.*, 2004). En *H. aduncum*, se describió una alta actividad de fosfatasas ácidas y alcalinas en la forma adulta del parásito, siendo mayor en hembras debido al aumento del metabolismo relacionado con la reproducción (Zóltowska *et al.*, 2007).

En cuanto a su potencial alérgénico las fosfatasas ácidas forman una familia de alérgenos (AF062) cuyo representante, Api m 3, es el alérgeno principal del veneno de la abeja doméstica (*A. mellifera*). El uso combinado del antígeno recombinante de este alérgeno junto con Api m 10 y Api m 1 recombinantes aumenta la sensibilidad del diagnóstico de los pacientes alérgicos a himenópteros con doble sensibilización (antófilos y vespídeos), sobre todo en aquellos casos que son Api m 1 negativos (Frick *et al.*, 2015).

AT-6 y AT-18 son proteínas de choque térmico (Hsp), que se clasifican según su peso molecular; así AT-6 pertenece a la familia Hsp70 y AT-18 a la familia Hsp90. AT-6 presenta los aminoácidos conservados característicos de las proteínas Hsp 70: Q60, R78, D82, K85, N86, D162, Y163, R286, Q289, K290, R293, K297, E311, E313, E314, además de los 15 residuos característicos del dominio de unión a ATP (NBD) y los 11 característicos del dominio de unión a sustrato (SDB). AT-6 exhibe un 90% y 91% de similitud con las Hsp70 C de *T. canis* (KHN87109) y *A. suum* (ERG82498) respectivamente. Por otro lado AT-18, perteneciente a la familia Hsp90, es un

homodímero que tiene en el extremo N-terminal un dominio ATPasa altamente conservado, perteneciente a la superfamilia ATPasa Histidina quinasa-like (HATPasa_c), con un sitio de unión a ATP y otro de unión a Mg²⁺, así como un motivo G-X-G (Mühlschlegel *et al.*, 1995; Dutta e Inouye, 2000).

El papel biológico de las Hsp en anisakidos se ha estudiado con genes diferentes a los obtenidos en el presente trabajo. Los genes hsp90 de cinco especies del género *Anisakis*, *A. typica* (AIU38243), *A. pegreffii* (AIU38242), *A. paggiae* (AIU38244), *A. brevispiculata* (AIU38246) y *A. physeteris* (AIU38245) se han clonado y comprobado sus niveles de expresión tras someter las larvas a choques térmicos en frío y caliente. En el caso de *A. pegreffii*, especie del complejo *A. simplex* s.l., se detectó una respuesta más intensa de la expresión del gen hsp90 después del estrés térmico en comparación con el estrés frío. Las larvas de *A. pegreffii* eran capaces de tolerar el estrés térmico a corto plazo, (permanecían vivas tras 7 min a 50 °C), sugiriéndose que esa capacidad pueda estar relacionada con la alta expresión de Hsp90 (Chen *et al.*, 2014). Además al estudiar los perfiles de expresión de las proteínas Hsp70 y Hsp90 en diferentes estados de desarrollo de *A. pegreffii*, se detecta una mayor expresión proteica, en las larvas 4 en comparación con larvas 3; esto podría tener una función de protección en la supervivencia y desarrollo del nematodo, especialmente en el cambio de estadio L3 a L4 (Chen *et al.*, 2015).

Como se ha comentado anteriormente, en el análisis del alérgeno putativo AT-13, Fæste *et al.* (2014) identificaron potenciales alérgenos de *A. simplex* por comparación de proteínas del parásito con alérgenos definidos en la base de datos AllFam y con alérgenos conocidos de nematodos, insectos o crustáceos. En el trabajo utilizaron dos cohortes, un grupo de pacientes españoles diagnosticados de anisakiosis gastroalérgica (AGA) y un grupo de pacientes noruegos con sensibilización frente a *A. simplex* s.l. y ácaros el polvo. Los autores identificaron una proteína de 68 kDa altamente reactiva con los sueros de los pacientes noruegos co-sensibilizados y sugirieron que podría tratarse de la Hsp70 identificada por similitud de los péptidos con la Hsp 70 de *C. elegans* (AAA28078). Además indicaron que esta proteína podría ser una de las responsables de la reacción cruzada con ácaros del polvo por reactividad cruzada con el alérgeno de *Dermatophagoides farinae* caracterizado por Aki *et al.* (1994). AT-6 porta en las posiciones 201-217 el péptido IINEPTAAAIAYGLDKK identificado por Fæste *et al.* (2014). AT-6 se corresponde con la Hsp 70 identificada en dicho trabajo y propuesta como responsable de la reactividad cruzada en los pacientes co-sensibilizados.

Por otro lado, en un estudio llevado a cabo por Arcos *et al.* (2014), donde evaluaron el perfil proteico y los alérgenos expresados diferencialmente por *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, identificaron cuatro *spots* de *A. simplex* s.s. (S₁₅-S₁₈) correspondientes a Hsp 70 por similitud con Hsp de otros organismos presentes en las bases de datos. Los autores trabajan con sueros de pacientes con procesos alérgicos asociados a *Anisakis* (comprobada por pruebas serológicas, SPT e historia clínica) en los que no se detectó IgE específica a ácaros del polvo. No se encontró similitud del 100% entre ningunos de los péptidos de las cuatro Hsp 70 descritas y AT-6, como ocurría con

el péptido descrito por Fæste *et al.* (2014), por lo tanto AT-6 no se corresponde a ninguna de ellas. En realidad, los seis péptidos presentan 100% de similitud con la Hsp 70 de *A. pegreffii* (AIU38242) descrita por Chen *et al.* (2014). Por tanto, se puede identificar la Hsp 70 detectada por Arcos *et al.* (2014), como el ortólogo en *A. simplex* s.s. de la Hsp 70 de *A. pegreffii* (AIU38242). No es de extrañar que estas proteínas estén tan conservadas porque *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* son especies gemelas y además, las secuencias de las Hsp suelen estar altamente conservadas entre especies, de hecho se utilizan como marcadores filogenéticos (Fast *et al.*, 2002). De hecho, la Hsp 70 de *A. pegreffii* (AIU38242) mantienen una alta similitud con otros ortólogos de esta proteína descritos en el género *Anisakis* como *A. typica* (99% AIU38243), *A. paggiae* (99%, AIU38244), *A. brevispiculata* (99%, AIU38246) y *A. physeteris* (98%, AIU38245).

Baird *et al.*, (2016) tras sintetizar, ensamblar y anotar los transcriptomas de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, identificaron alérgenos putativos mediante comparación de transcritos con la base de datos de *AllergenOnline*. Predijeron 5 transcritos de *A. simplex* s.s. y 6 de *A. pegreffii* como Hsp 70 con potencial alérgico. Uno de los transcritos Unigene9825_AS1A (predicho para *A. simplex* s.s.) se corresponden con la Hsp 70 AT-6, aunque está incompleto (258 aminoácido versus 657 de AT-6). No se encuentra el correspondiente ortólogo en *A. pegreffii*.

Las proteínas Hsp70 son inmunodominantes y se han identificado como alérgenos en ácaros del polvo doméstico, en una proteína de unión a IgE de cucaracha (*B. germanica*), así como en alimentos como la cebada y el maíz (Aki *et al.*, 1994; Chiung *et al.*, 2000; Chuang *et al.*, 2010). Algunas de las Hsp 70 de las especies formadas por el complejo *A. simplex* s.l. muestran un alto potencial alérgico teórico (predicciones de Baird *et al.*, 2016 y de la presente memoria) y por las evidencias experimentales del trabajo de Arcos *et al.* (2014), se propone que al menos una de ellas pueda tener un papel relevante en la reactividad cruzada en los pacientes co-sensibilizados con ácaros del polvo.

En relación con AT-21 y AT-22, indicar que pertenecen a la familia formada por proteínas de unión a feromonas (PBP) que se asocian con moléculas odoríferas generales (GOBP). Se caracterizan por ser proteínas de bajo peso molecular (15,6 y 16,3 kDa respectivamente) con seis cisteínas con un patrón conservado (AT-21: CX₁₂CX₁₉CX₃₇CX₁₈CX₄₆CX₂ y AT-22: CX₁₂CX₁₈CX₃₈CX₁₈CX₄₇CX₁) (Vogt *et al.*, 1991). AT-21 presenta un 97% de similitud con la proteína 1 relacionada con la subfamilia D7 de *Anopheles stephensi* (CAC70633) y AT-22 presenta un 100% de similitud con el precursor de la proteína salivar D7-4 de *A. stephensi* (AAO74838). Esta alta identidad entre proteínas de nematodos y artrópodos es un hecho conocido, ambos filos tienen en común su desarrollo a través de mudas (ecdisis) y la posesión una cutícula externa y de hecho se agrupan en el clado Ecdysozoa (Aguinaldo *et al.*, 1997; Telford *et al.*, 2008).

La subfamilia D7 está formada por proteínas salivares de dípteros hematófagos. Aunque su función es desconocida, se presume que juega un papel importante en la degradación del alimento (sangre). Se expresa principalmente en hembras y representa entre el 10% al 50% de

las proteínas salivares de los mosquitos tales como *A. aegypti*, *Anopheles gambiae* y *A. stephensi* (Valenzuela *et al.*, 2002, 2003). En nematodos se desconoce su función.

El último alérgeno predicho AT-15 pertenece a la familia de proteínas conocidas como “poliproteínas alérgicas de nematodos” (NPA). Las NPAs son proteínas exclusivas de filo, con representantes tanto en nematodos parásitos de animales y plantas como en nematodos de vida libre. AT-15 exhibe similitud con otras NPAs de nematodos parásitos como *T. canis* (DVA-1, 53%, KHN85858) o *B. malayi* (BMA-NPA-1, 36% CRZ25178). El primer miembro de esta familia que se describió fue ABA-1 del nematodo *A. suum*. Esta proteína se expresaba abundantemente en todos los estadios larvarios y en el adulto. Es una proteína multimérica (con estructuras repetidas en tándem) que se procesa dando lugar a unidades menores de idéntico tamaño (15 KDa) con capacidad de unión a lípidos pequeños, tales como ácidos grasos y retinoides (McGibbon *et al.*, 1990; McGibbon y Lee, 1995; Jones *et al.*, 2009; Meenan *et al.*, 2011; Kennedy *et al.*, 2011). La NPA de *Dictyocaulus viviparus* (DVA-1) está formada por 12 subunidades pero, a diferencia de ABA-1, las subunidades presentan un alto grado de variaciones entre sí (Britton *et al.*, 1995). AT-15 presenta 5 subunidades con grandes diferencias entre ellas, similares a las observadas en DVA-1. Además, presenta un posible sitio de unión a enzima formado por 4 argininas (posición 326-330) así como una región rica en histidinas (HDHSSHHHHHHQRR), características consistentes a las identificadas en otras proteínas de esta familia (Kennedy, 2000).

El potencial alérgico de las NPAs está demostrado y aunque se sabe que estas proteínas tienden a ser dianas de IgE, la estructura de la proteína no revela la naturaleza de este proceso. Kennedy (2011) en una interesante disertación sobre la estructura de las NPAs planteó que una posible explicación sea su naturaleza rica en lisinas y ácidos glutámicos, que lo asemejaría a otros alérgenos o epitopos caracterizados por un alto contenido en residuos aminoacídicos cargados, o incluso planteó la posibilidad de que las NPAs contengan un patrón molecular asociados a patógenos (PAMP) exclusivo de nematodos en la zona hidrofóbica correspondiente a la unión de lípidos.

Veintitrés de los 24 alérgenos putativos predichos en la presente memoria se engloban en 10 familias descritas de alérgenos y uno de ellos se corresponde con las “poliproteínas alérgicas de nematodos” (NPA) que son exclusivas de nematodos. Se sabe que los alérgenos están presentes en unos grupos minoritarios de proteínas y que las dianas de IgE en los helmintos pertenecen a estas mismas familias. En los helmintos bien adaptados, las respuestas Th2 se moderan por las proteínas inducidas por el parásito. Son respuestas fisiológicas en las que los helmintos generan respuestas reguladoras, con activación alternativa de macrófagos, producción de citoquinas inmunoregulatoras (IL-10 y TGF- β), o producción de IgG4 como anticuerpos bloqueantes para prevenir la degranulación de mastocitos; en definitiva, moderan la respuesta Th2 inflamatoria. En cambio, en helmintos poco adaptados o accidentales, como es el caso de la infección humana por *A. simplex* s.l. la liberación de estas mismas sustancias desencadena reacciones alérgicas. Las proteínas predichas como alérgicas en la presente memoria son

proteínas con una función biológica definida en el ciclo natural de *A. simplex* s.l. en el que, sin lugar a dudas, la mayoría de ellas no desencadenarían procesos alérgicos graves. Sin embargo en el contexto de una infección accidental, como la humana, las reacciones alérgicas desencadenadas y los síntomas gástricos son un mecanismo de expulsión de la larva, un mecanismo frente a un parásito que no ha co-evolucionado con el humano (Daschner *et al.*, 1998; McSorley *et al.*, 2012; Fitzsimmons *et al.*, 2014).

El conocimiento de los alergenios implicados en los procesos asociados a la infección por *A. simplex* s.l. y su naturaleza proporcionaría herramientas adecuadas para la investigación de múltiples aspectos sin resolver relacionados, entre otros, con los diferentes fenotipos clínicos de las alergias, el desarrollo de nuevas tecnologías diagnósticas (como el diagnóstico por componentes) y la elucidación de reactividades cruzadas. Los alergenios predichos pretenden ser un pequeño aporte a este conocimiento. La confirmación experimental de su naturaleza y su utilidad práctica, aunque necesarios, quedan fuera del alcance de la presente memoria.

2. Búsqueda de alergenios de *A. simplex* s.l. mediante análisis proteómicos

La búsqueda de alergenios de la L3 del complejo *A. simplex* s.l. y sus especies gemelas caracterizados hasta el momento se ha llevado a cabo por diferentes aproximaciones basadas en (I) el inmunocribado de genotecas de expresión bien con sueros de pacientes (Pérez-Pérez *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2007-a; Caballero *et al.*, 2011; Kobayashi *et al.*, 2011) bien con anticuerpos monoclonales (Rodríguez *et al.*, 2008), (II) el cribado de una colección de fagos con péptidos diferentes, expuestos en su superficie (*phage display system*), con el suero de un paciente con historia clínica de sensibilidad a *A. simplex* s.l. (López y Pardo, 2011) y finalmente (III) aquellas en las que se combina el inmunocribado con las técnicas de proteómica basadas en espectrometría de masas (Arcos *et al.*, 2014; Fæste *et al.*, 2014). Estas últimas si bien proporcionaron mayor número de resultados, estos se quedaban mayoritariamente en la identificación de péptidos específicos y proteínas homólogas en otros microorganismos; debido al escaso número de genes de *A. simplex* s.l. anotados funcionalmente en el momento de la realización de dichos estudios. Por todo ello, en la presente memoria nos planteamos el uso del inmunocribado asociado a las técnicas de proteómica, basadas en espectrometría de masas, combinado con la transcriptómica para la identificación y elucidación de nuevos alergenios de *A. simplex* s.l.

En el presente trabajo se utilizaron como antígenos los productos de ES liberados por las L3 parasitarias de *A. simplex* s.l. tras su cultivo y recogidos a las 24, 48, 72 y 96 horas del inicio del cultivo. Hasta ahora la mayoría de los ensayos de proteómica enfocados a la identificación de alergenios han utilizado antígenos crudos en su experimentaciones (Arcos *et al.*, 2014; Fæste *et al.*, 2014) sin embargo, se sabe que los antígenos ES son los principales responsables de las reacciones alérgicas desencadenadas en humanos (Kim *et al.*, 2005); probablemente en otros experimentos no se hayan utilizado por la dificultad que conlleva la obtención de antígenos de ES en las cantidades suficientes para llevar a cabo este tipo de ensayos. Para la obtención de los antígenos

de ES de la presente memoria, los cultivos se mantuvieron con ácido clorhídrico diluido a 37 °C y con un 5% de CO₂, simulando las condiciones fisiológicas del estómago ya que se ha demostrado que los antígenos obtenidos por este sistema son reconocidos por la IgE específica tanto de pacientes, no alérgicos al pescado pero, con síntomas de urticaria, angioedema, o anafilaxia tras su ingesta, como por pacientes con anisakiosis intestinal (Moneo y Caballero, 2002).

Para el inmunocribado se utilizaron conjuntos de sueros de 4 grupos de pacientes seleccionados prospectivamente según criterios clínicos y analíticos como: anisakiosis gastroalérgica (AGA), urticaria crónica asociada a sensibilización a *Anisakis* spp. (UC+), anisakiosis digestiva (D) y sensibilización subclínica (SBC), ya que este enfoque permitía además de la identificación de nuevos alérgenos, analizar la posible asociación entre el reconocimiento diferenciado de alérgenos y la aparición de diferentes patologías. Los pacientes aquejados de AGA mostraron el patrón de inmunorreconocimiento claramente más intenso, tanto cualitativa como cuantitativamente, de todos los grupos estudiados. Este hecho parece lógico ya que la anisakiosis gástrica, por definición, es una reacción de hipersensibilidad aguda que emerge en el contexto de un parasitismo agudo por el nematodo *A. simplex* s.l. (Daschner *et al.*, 1998; López-Serrano *et al.*, 2000-a; López-Serrano *et al.*, 2000-b). Tiene sentido que sea precisamente este grupo el más reactivo con una reacción muy potente en la que se reconocieron proteínas alergénicas que abarcaban un amplio rango de Pm, desde 15 kDa hasta 100 kDa y con diferentes puntos isoeléctricos (pH de 4 a 8). Se seleccionó un *spot*, máximo dos, de cada una de las 15 zonas inmunorreactivas, lo que dio lugar a la identificación de 16 alérgenos, dos ya caracterizados (Ani s 1 y Ani s 4) y 14 nuevos.

Los pacientes con anisakiosis gástrica (D) presentaron síntomas digestivos pero no manifestaciones alérgicas y su patrón de inmunoreactividad fue más débil que el grupo de AGA. Este hecho es explicable ya que durante la primera fase de la parasitación la larva 3 de *Anisakis* spp. libera proteasas que le ayudan a penetrar en la mucosa gastrointestinal. Posteriormente, una vez que el nematodo se inserta en la mucosa, secreta proteínas que inducen una respuesta por parte del individuo parasitado predominantemente de tipo Th2 (liberación de IL-4, IL-5, reclutamiento de eosinófilos, etc.) con estimulación de la producción de IgE total y específica frente al parásito. Si la respuesta se produce en un marco local, se manifiesta como una anisakiosis gástrica aguda, en la que predomina los síntomas gástricos y no los alérgicos, como es el caso del grupo D con un patrón menos inmunorreactivo que el del grupo AGA donde se ha promovido una respuesta sistémica (Alonso-Gómez *et al.*, 2004). El grupo D mostró solamente seis zonas inmunorreactivas, de las que se seleccionaron 7 *spots*, que tras su digestión permitieron identificar 1 alérgeno ya caracterizado (Ani s 1) y 6 nuevos.

Aunque se observó un reconocimiento diferenciado de los alérgenos según la entidad clínica, no se identificó ningún alérgeno en el grupo de pacientes con síntomas digestivos (D) y en el grupo de pacientes con urticaria crónica (UC+) que no hubiese sido también reconocido por las IgE del grupo de AGA. Este reconocimiento diferenciado ya se había observado, de manera

individual, para algunos alergenicos. Así, Cuellar *et al.* (2012) determinaron que los alergenicos recombinantes Ani s 1 y Ani s 7 eran reconocidos por la IgE específica del 82,1% y 92,9% de los pacientes aquejados de AGA y por el 42,5% y 92,5% de los pacientes aquejados de UC+.

La zona más inmunorreactiva en todos los grupos [$A1_{AGA} = A1_D = A1_{UC+}$] se correspondía a un conjunto de proteínas con un peso molecular inferior a 25 kDa y cuya elevada reactividad fue especialmente llamativa en el grupo de AGA. La identificación del *spot* (3) más reactivo se correspondía con una de los alergenicos putativos (AT-10) previamente predicho, por aproximaciones bioinformáticas, en la presente memoria, y al que habíamos identificado como Ani-VAL1 (AT-10). Por lo tanto ATP-1= Ani-VAL1 (AT-10) y como tal nos referiremos en la presente memoria.

Ani-VAL1 (AT-10) presenta un dominio SCP-like, y pertenece a la misma familia que los alergenicos principales Ves v 5 de las avispas vulgares (*Vespula* spp.) y Pol d 5 de las avispas cartoneras (*Polistes dominula*). En un interesante trabajo publicado en el 2014 (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2014) se evidenció la existencia de reactividad cruzada entre alergenicos del veneno de avispas y alergenicos de *A. simplex* s.l. Un 40% de los pacientes alérgicos al veneno de las avispas mostraban IgE anti-*A. simplex* s.l. y un 20% reconocían al menos uno de los alergenicos recombinantes testados (Ani s 1, Ani s 5, Ani s 9 y Ani s 10), mientras que un 44% de pacientes alérgicos a *Anisakis* spp. mostraban IgE específica frente al veneno de *Vespula* spp. y el 16% detectaba al menos uno de los alergenicos testados.

Con estos antecedentes, intentamos ahondar un poco más en la naturaleza del alergenico Ani-VAL1 (AT-10) utilizando para ello información del alergenico principal Ves v 5 de la avispa común (*Vespula vulgaris*), del que se han caracterizado 17 epitopos T (Bohle *et al.*, 2005). Al comparar las propiedades físico-químicas y similitud de estos epitopos con el alergenico Ani-VAL1 (AT-10) -mediante el índice PD- se predicen cuatro posibles epitopos (151-163, 154-165, 145-160), tres solapantes entre ellos, y dos áreas inmunorreactivas hipotéticas (151-166 y 186-198). Estas áreas que incluían la zona de un epitopo reconocido por el 23,5% de los pacientes alérgicos a Ves v 5, no incluían los aminoácidos correspondientes al epitopo inmunodominante (reconocido por el 54% de los pacientes) descrito para el alergenico Ves v 5.

Sin embargo, esta área inmunorreactiva postulada para Ani-VAL1 (AT-10) coincide con la predicha en este mismo alergenico Ani-VAL1 (AT-10) al hacer los estudios comparativos con los epitopos de tipo IgE descritos en la molécula homóloga del nematodo *N. americanus* Na-ASP-2. Dichos epitopos IgE habían sido identificados como los responsables de los efectos adversos (reacciones alérgicas) que obligaron retirar esta vacuna tras su administración en una sola dosis (Diemert *et al.*, 2012).

Estos resultados nos llevan a postular que Ani-VAL1 (AT-10) podría ser uno de los alergenicos responsables de las reacciones urticariales que se producen tras la infección parasitaria.

Así mismo, *Ani*-VAL1 (AT-10) podría ser uno de los alergenicos responsables de las reacciones cruzadas descritas entre *A. simplex* s.l. y el veneno de las avispas, si bien este hecho necesita ser confirmado experimentalmente.

- Epitopos putativos por ID con epitopos T de Ves v 5

MSALFALLGFLPLIVTAQWDCPNSSLTPAAKQAIVAKHNELRETIVHGKALRKGDVPIPKAANMYAM
KWDCDLEKQSQEWVNRCVFQHSPEFRHAGENIFASSTTGSGLGKYGVTAASEAWWSELKRVTDMMIKIENNEV
PFG **GPIFGV** **AGHWTQMAWGETTKV** GCGIQNCTRGTSWKQVNVV **CEYRNQGNFWSA** PIYKIGDGCHQDSDCT
SFQGSKCDTSTNLCLSP

154- **WTQMAWGETTKV** -165

145- **GPIFGVAGHWTQMAW** -160

186- **CEYRNQGNFWSA** -198

151- **AGHWTQMAWGET** -163

- Epitopos putativos por ID con epitopos T / IgE de Na

MSALFALLGFLPLIVTAQWDCPNSSLTPAAKQAIVAKHNELRETIVHGKALRKGDVPIPKAANMYAM
KWDCDLEKQSQEWVNRCVFQHSPEFRHAGENIFASSTTGSGLGKYGVTAASEAWWSELKRVTDMMIKIENNEV
PFGGP **IFGVAGHWTQMAW** **GETTKV** **GCGIQN** CTRGTSGWK **QVNVVCEYRN** **QGNFWSAPIYKIG** DGCHQDSDCT
SFQGSKCDTSTNLCLSP

160- **WGETTKV** **GCGIQN** -172

182- **QVNVVCEYRN** -19

148- **IFGVAGHWTQMAW** -160

192- **QGNFWSAPIYKIG** -204

Además, comparamos la secuencia de este alergenico *Ani*-VAL1 (AT-10) de *A. simplex* s.l. con las secuencias anotadas para la misma molécula en *A. simplex* s.s. (Unigene7355_AS1A) y en *A. pegreffii* (Unigene2853_AP1A) obtenidas de las bases de datos del transcriptoma de estas especies (Baird *et al.*, 2016). En la zona inmunodominante no se detectó ningún cambio entre las secuencias de *Ani*-VAL1 (AT-10) de *A. simplex* s.l. versus *A. simplex* s.s. y se detectó un solo cambio (164-T/S) entre estos últimos y *A. pegreffii*. El cambio entre estos dos aminoácidos, muy parecidos con grupos hidroxílicos, no debería a priori influir en su capacidad alergénica. El alergenico *Ani*-VAL1 (AT-10) tendría el mismo potencial alergénico en ambas especies. Quiazon *et al.* (2013) analizaron las diferencias en las secuencias de los alergenicos Ani s 1, Ani s 2, Ani s 9 y Ani s 12 en las especies *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* y comprobaron la existencia de variaciones intra e inter especie, en las mismas posiciones que no les permitían asignarlas a una especie concreta. En el caso concreto de Ani s 1 encontraron una única diferencia entre las dos especies y dos respecto al Ani s 1 publicado por Shimakura *et al.* (2004), diferencias que no coincidían en los residuos de los epitopos IgE

descritos para este alérgeno, sugiriendo que el riesgo teórico de desencadenar reacciones alérgicas, al menos para estos alérgenos, es el mismo para ambas especies.

Otra zona reactiva, [A3_{UC+}= A10_{AGA}= A2_D], aunque con menor reactividad que la anterior, que fue también reconocida por los grupos de las tres entidades clínicas (AGA, D y C+) en estudio, mostró alérgenos con un peso molecular entre 50 y 75 kDa (Fig. 12). El *spot* 5 seleccionado en esta área proporcionó un alérgeno (ATP-9) de Pm teórico de 58,6 kDa sin el péptido señal, correspondiente a una esterasa intestinal de nematodos, que pertenece a la familia de las carboxil-esterasas, con la triada catalítica clásica, S₂₁₀, E₃₂₆, H₄₄₆. ATP-9 presenta similitud con genes anotados en otros nematodos como *T. canis* (51%, KHN80335) y *A. suum* (31%, ERG87820).

ATP-9 también tiene similitud con el alérgeno Api m 8 de la abeja doméstica (*A. mellifera*), que es también una esterasa (carboxilasa-6 del veneno de abeja). El gen de este alérgeno fue descrito con la publicación del genoma de la abeja doméstica (*A. mellifera*), que ha sido recientemente ensamblado y anotado de nuevo (Weinstock *et al.*, 2006; Elsik *et al.*, 2014). Se desconoce la relevancia real en clínica de este alérgeno, en relación al porcentaje de sensibilidad solamente hay un dato que indica que Api m 8 fue reconocida por la IgE del 46% de los sueros de 28 pacientes alérgicos al veneno de abeja (*Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee*).

El *spot* (2) se recortó de la tercera y última zona reactiva reconocida por las IgE de los pacientes de los tres grupos en estudio. El análisis mediante huella péptidica combinada con MS/MS de los péptidos obtenidos tras la digestión del *spot* 2 nos permitió su identificación como Ani s 1. Este alérgeno ha sido ampliamente caracterizado como alérgeno principal (Moneo *et al.*, 2000; Martínez-Aranguren *et al.*, 2014) por lo que parece lógico su reconocimiento por todos los grupos estudiados (AGA, D y UC+). En un estudio previo Cuellar *et al.* (2012) determinaron que Ani s 1 era reconocido por el 82,1% de los pacientes aquejados de anisakiosis gastroalérgica y tan sólo por el 42,5% de pacientes con urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis*. En el presente trabajo no podemos indicar si hubo o no un porcentaje diferente de reconocimiento entre ambos grupos, ya que se utilizaron grupos de sueros y no sueros individualizados.

En general en el grupo de digestivo (D), las áreas reactivas mostraron patrones similares a los de AGA aunque con mucha menos reactividad. Tres de las cinco zonas inmunorreactivas fueron reconocidas exclusivamente por los grupos de anisakiosis gastroalérgica (AGA) y digestivo (D) pero no por el grupo de urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis* (UC+), [A4_D= A8_{AGA}], [A5_D= A13_{AGA}], [A6_D= A12_{AGA}] (Fig. 12).

En esta primera zona [A4_D= A8_{AGA}] se identificó un alérgeno (ATP-7, *spot* 10) correspondiente a una glutamato carboxi-peptidasa. ATP-7 presentó similitud con proteasas de esta familia identificadas en *A. suum* (74%, ERG82666), *B. malayi* (59%, CDP95587) y *L. loa* (59%, EFO27955). Aunque se desconoce su función, este tipo de metalo-proteasas con actividad co-

catalítica con iones de zinc, se han visto involucradas en el proceso de muda en nematodos como *Haemonchus contortus* (Gamble *et al.*, 1989). Si esta fuese la función del alérgeno ATP-7 en *A. simplex* s.l., parece lógico que hallemos este alérgeno en los Ag ES utilizados, ya que en su producción se recogieron los productos de ES del parásito de las 24, 48, 72 y 96 h tras su cultivo, tiempo durante el que la larva 3 muda a larva 4.

En la segunda zona inmunorreactiva [A_{5D}= A13_{AGA}] se seleccionaron dos *spots* (14a y 14b) que permitieron la identificación de los alérgenos ATP-12 y ATP-13 respectivamente.

El alérgeno ATP-13 se identificó a través de las bases de datos del NCBI como un antígeno de 24 kDa de *Anisakis* con similitud a las proteínas 22U-like (As22U) previamente descritas en filarias, de función no definida y que provocan una respuesta inmune muy potente durante la infección (Sutanto *et al.*, 1985; Vieira *et al.*, 1997; Frank *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2012). Se ha visto que la exposición de células intestinales epiteliales a As22U recombinante induce un incremento en la expresión de los genes de linfopoyetina tímica estromal (TSLP), IL-25 (IL-17E) y CXCL1 (Gro- α) tras seis horas de tratamiento. Además, a las 14 horas del tratamiento se observó un incremento de los niveles de expresión de genes de citoquinas quimiotácticas reguladas por el timo. Ya que la IL-25 y TSLP son citoquinas que inician la respuesta alérgica Th2, los autores sugirieron para As22U un posible papel alérgico (Park *et al.*, 2012). En el presente trabajo se confirmó la naturaleza alérgica de As22U (ATP-13) ya que fue reconocido por los anticuerpos IgE tanto del grupo de AGA como de D.

Llama la atención que en una zona de reconocimiento exclusivo del grupo AGA [A3_{AGA}] se identifica un nuevo alérgeno (AT-4, procedente del *spot* 4) de 24 KDa también con similitud con las proteínas 22U-like (As22U). Este nuevo alérgeno AT-4, con diferente secuencia que el descrito por Park *et al.* (2012), mantenía la misma estructura con 16 cisteínas características en posiciones conservadas. Se propone la existencia de una familia de proteínas alérgicas con similitud a las proteínas 22U-like, de la que As22U y AT-4 serían dos miembros diferentes.

Por otro lado, AT-4 fue reconocida intensa y exclusivamente por los sueros de pacientes aquejados de AGA, reacción alérgica aguda que solo se produce en el contexto de un parasitismo agudo gástrico cuando las larvas de *A. simplex* s.l. intentan penetrar en la mucosa gástrica (Daschner *et al.*, 1998; López-Serrano *et al.*, 2000-b; Alonso-Gómez *et al.*, 2004). Mientras que As22U reaccionó tanto con el grupo de AGA como por el D; los pacientes incluidos el último grupo presentan manifestaciones gástricas, sin síntomas alérgicos, también en el contexto de un parasitismo por *A. simplex* s.l. Por ello, se postula que As22U y AT-4, miembros de la nueva familia de proteínas alérgicas propuesta anteriormente, pudiesen ser marcadores de infección activa. Dado que los ensayos experimentales se han hecho con grupos de sueros, esta última aseveración habría que comprobarla experimentalmente con un número amplio de sueros individualizados.

El alérgeno ATP-12 (*spot* 14a) se corresponde con una proteína con cuatro fragmentos ordenados en tándem con una estructura CX₁₉₋₂₅CX₉₋₂₅CX₇₋₁₉CX₆₋₁₃, similar a las descritas para los alérgenos Ani s 12 (CX₁₃₋₂₅CX₉CX_{7,8}CX₆) y Ani s 7 (CX₁₇₋₂₅CX₉₋₂₂CX₈CX₆) sin que se pueda relacionar con ninguno de ellos (Rodríguez *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2011). La búsqueda de este alérgeno en las bases de datos mostró que ATP-12 solo está descrito en el transcriptoma de *A. simplex* s.s. y no en el de *A. pegreffii*. Esta expresión diferencial de proteínas potencialmente alérgicas, entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, ya fue descrita por Arcos *et al.* (2014) quienes identificaron 59 *spots* en *A. simplex* s.s. frente a 36 en *A. pegreffii* mediante estudios de *western blotting*/proteómica con antígenos crudos de ambas especies parasitarias y sueros de pacientes aquejados de procesos alérgicos asociados *Anisakis* spp.

En la tercera zona reactiva común al grupo AGA y D [A_{6D}= A12_{AGA}], se recortó un *spot* (12), cuya identificación dio lugar al alérgeno ATP-10, correspondiente a una metilmalonil-CoA epimerasa (MCE), perteneciente a la superfamilia de metalo-enzimas implicadas en reacciones de epimerización de aminoácidos de cadena larga y ácidos grasos. En *C. elegans* se ha descrito una MCE expresada mayoritariamente en los músculos de la pared que conforman el cuerpo del parásito, además de en la faringe e hipodermis. Se determinó que mutaciones en el gen que codifica MCE, no alteraban el fenotipo del parásito, pero si aumentaba la resistencia a especies reactivas de oxígeno, permitiendo una mayor tasa de supervivencia frente a condiciones de estrés oxidativo (Kühnl *et al.*, 2005).

Los patrones de inmunorreconocimiento correspondientes al grupo de AGA mostraron seis zonas reactivas exclusivas, de las que se seleccionaron uno ó dos *spots* por área, identificándose 8 alérgenos correspondientes a: proteína con dominio ML (ATP-11), alérgeno de 24 kDa (ATP-4 ya descrito por su relación con As22U), proteína de función desconocida (ATP-2), proteína con dominio SCP (ATP-3), colágeno 40 de cutícula (ATP-5 y ATP-8), aspartil proteasa (ATP-6) y neprilisina (ATP-13).

El alérgeno ATP-11 pertenece a la familia de proteínas con dominios ML (de reconocimiento de lípidos relacionado con MD-2). Este dominio está formado por dos hojas β antiparalelas plegadas estabilizadas por 3 puentes de disulfuro, con una cavidad hidrofóbica que permite la interacción con lípidos. ATP-11 presenta similitud con proteínas de otros nematodos, que contienen este dominio, como *T. canis* (72%, KHN72353), *B. malayi* (51%, CTP81414) y *L. loa* (53%, EFO27572).

Se han descrito proteínas con dominios ML en el grupo 2 de alérgenos de los ácaros, como el alérgeno principal Der p 2 del ácaro del polvo (*D. pteronyssinus*) y el alérgeno Der f 2 del ácaro de la harina (*D. farinae*) (Yu-bao *et al.*, 2010; Kühnl *et al.*, 2005). Der p 2 es uno de los alérgenos más importantes de los ácaros del polvo y más el 90% de los alérgicos a los ácaros del polvo están sensibilizados frente a este alérgeno (Thomas *et al.*, 2002). En un estudio llevado a cabo con granjeros con alergia a los ácaros del polvo se demostró la existencia de reactividad

cruzada entre *A. simplex* y cuatro especies diferentes de ácaros del polvo *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, y *D. pteronyssinus* (Johansson *et al.*, 2001). Ventura *et al.* (2008) describieron una reacción adversa grave en un paciente alérgico a *Anisakis* tras inmunoterapia específica contra los ácaros del polvo. Hace tiempo que se conoce la reactividad cruzada entre los dos alérgenos principales nativos Der p 2 y Der f 2 de los ácaros del polvo (Yasueda *et al.*, 1989); mediante estudios cristalográficos se atribuyó esta reactividad cruzada a la presencia de áreas conservadas, que presentan epitopos de unión a IgE, en la superficie de ambos alérgenos (Johannessen *et al.*, 2005). Por último, hay que destacar que estudios de dinámica molecular con ATP-11, utilizando los modelos cristalografiados de Der p 2 y Der f 2 (Derewenda *et al.*, 2002; Johannessen *et al.*, 2005) nos podrían dar una idea si los residuos en las áreas expuestas están conservados entre estos alérgenos y ATP-11.

El alérgeno ATP-5 pertenece a la superfamilia del colágeno. Presenta similitud con la triple hélice de colágeno 20 y 12 de *T. canis*. Está formado por 20 repeticiones de la secuencia G-X-Y, que constituyen una triple hélice; el primer aminoácido corresponde a una glicina y, aunque el segundo y tercero puede ser cualquier aminoácido, la prolina e hidroxiprolina son los más frecuentes en estas posiciones. Así mismo, el alérgeno ATP-8 corresponde a un fragmento de colágeno. Las funciones del colágeno se asocian con la formación del exoesqueleto del parásito y el movimiento, además de actuar como barrera de protección frente al entorno. El colágeno y proteínas parecidas (colágeno-like) son el componente principal de la cutícula de los nematodos. En *C. elegans* las diferentes formas de colágeno cuticular están codificados por una familia multigénica con más de 150 miembros (Yin *et al.*, 2015). Respecto a su potencial alérgico, el colágeno ha sido identificado como alérgeno en vertebrados, como es el caso del colágeno del pescado y de la carne (Hamada *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2014). Así se ha demostrado que la laminina (el motivo carbohidratado α -Gal que porta) y el colágeno VI (su cadena α -1) son las proteínas de la carne que reaccionan predominantemente con la IgE sérica en pacientes japoneses con alergia a este alimento (Takahashi *et al.*, 2014).

El alérgeno ATP-13 es una metalo-endopeptidasa dependiente de zinc, de la familia de las peptidasas M13, denominada neprilisina o endopeptidasa neutral. Presenta los motivos de unión a zinc, HEXXH y ENxADxGG, como parte de su sitio activo. ATP-13 presenta similitud con neprilisinias descritas en los nematodos *T. canis* (65%, KHN77448), *A. suum* (61%, ERG79441) y *C. elegans* (47%, NP_496490). En cuanto a su función, en otros nematodos se le ha asignado un papel en la alimentación del parásito. Así, en *A. caninum* se reportó una metalo-endopeptidasa (Ac-MEP-1) expresada en las microvellosidades del intestino y, en menor proporción, en el tegumento de la forma adulta. La localización de esta metalo-endopeptidasa, en las microvellosidades del intestino, sugería la participación de la enzima en el proceso de digestión de hemoglobina del hospedador (Jones *et al.*, 2002). Igualmente se ha descrito en *H. contortus*, nematodo que afecta a rumiantes, una metalo-peptidasa (MEP1) expresada en la superficie luminal del intestino del parásito e implicada en el proceso de nutrición (Redmond *et al.*, 1997); en *H. contortus* se han descrito un total de 4 metalo-endopeptidasas dependientes de zinc (Newlands *et al.*, 2006).

Solamente se identificó un área de alta reactividad reconocida exclusivamente por los pacientes de AGA y UC+. Esta área estaba compuesta por un conjunto de 2 alérgenos de menos de 15 kDa, uno de los cuales (*spot* 1) se correspondió con Ani s 4 (con un 100% de identidad), alérgeno resistente al calor, descrito por Rodríguez-Mahillo *et al.* (2007). Se trata de una cistatina de 12,7 kDa y sin sitios de glicosilación predichos. Un año más tarde los mismos autores identificaron una isoforma de Ani s 4, que solo difiere en un aminoácido en posición 25 L/P pero con diferente capacidad para unir IgE y activar basófilos (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008). En el presente trabajo la forma identificada fue la original de Ani s 4 (L₂₅) que fue reconocida tanto por los pacientes con AGA como por los de UC+.

Se analizaron las diferencias en los residuos aminoacídicos de los 14 alérgenos (ATP-1 a ATP-14, descritos a partir de la combinación de los ensayos de proteómica y los datos del transcriptoma MH de *A. simplex* s.l.) generados en la presente memoria, con los de sus homólogos correspondientes descritos en los transcriptomas de *A. simplex* s.s y *A. pegreffii* (Baird *et al.*, 2016) y en los transcritos del genoma de *A. simplex* s.l. (Howe *et al.*, 2016-a; Howe *et al.*, 2016-b) (Tabla 16). El transcriptoma MH y el genoma publicado por Sanger se obtuvieron a partir de L3 de bacaladitos (*M. poutassou*) procedentes de bancos de zonas pesqueras españolas; mientras que los transcriptomas de *A. simplex* s.s y *A. pegreffii* (Baird *et al.*, 2016) se sintetizaron a partir de L3 obtenidas de diferentes especies de caballa recogidas en Tokio (Japón), estornino (*Scomber japonicas*), caballa azul (*Scomber australasicus*) y chicharro (*Trachurus japonicus*). Las diferencias observadas en un mismo alérgeno entre las especies gemelas *A. simplex* s.s y *A. pegreffii*, se mantenían en el transcriptoma MH de *A. simplex* s.l. (sin diferencias con *A. simplex* s.s y con las mismas con *A. pegreffii*). Además, se observaban cambios que a priori no dependían de especie, ya que estos residuos estaban conservados en los transcriptomas de *A. simplex* s.s y *A. pegreffii* pero diferían de los del transcriptoma MH y de los transcritos del genoma de *A. simplex* s.l. (que a su vez estaban conservados entre ellos). Estas diferencias podrían deberse al distinto origen geográfico de las larvas 3 utilizadas en las diferentes preparaciones de los transcriptomas / genomas. A pesar de que los cambios coinciden con el uso de diferentes especies de pescados (bacaladitos *versus* caballa) no parece plausible que sean cambios derivados de la adaptación a los diferentes hospedadores, ya que los peces son hospedadores paraténicos de *A. simplex* s.l. donde la larva 3 parasitaria permanece enquistada, sin sufrir ningún cambio, hasta que los peces son depredados por los hospedadores definitivos (Køie, 2001). Por otro lado, los cambios coinciden en aquellos transcriptomas, no solo que derivan de larvas 3 de diferentes especies de hospedadores paraténicos sino también con las diferentes localizaciones geográficas, de donde procedían estos pescados (zona costera europea en el caso de los bacaladitos *versus* zona costera japonesa). Las variaciones podrían producirse como consecuencia de la adaptación del parásito adulto a hospedadores definitivos de diferentes áreas geográficas, que se transmiten a la progenie en un proceso de coevolución (Janzen, 1980) y que podrían explicar las diferencias / similitudes encontradas. En cualquier caso, dado que se desconocen las localizaciones geográficas de pesca

concretas y el número de secuencias analizadas es muy bajo (las correspondientes a los alérgenos obtenidos experimentalmente) no se puede confirmar esta hipótesis.

Como se ha visto para el alérgeno Ani-VAL1 (AT-10) o el Ani s 1 publicado por Quiázon *et al.* (2013), casos ambos en los que los epítomos IgE estaban descritos, la variaciones detectadas en las secuencias entre las especies no influirían en el potencial alérgico teórico de las mismas. Sin embargo, esto puede no ser un hecho común a todos los alérgenos del parásito, de hecho Arcos *et al.* (2014) describen una expresión diferencial de proteínas potencialmente alérgicas, entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*. En nuestro trabajo todos los alérgenos se obtuvieron a partir de los productos de ES de cultivos de larvas 3 de *A. simplex* s.l. y fueron reconocidos por los sueros de pacientes aquejados de diferentes formas clínicas asociadas a la infección por *Anisakis* spp. lo que indicaría su potencial utilidad diagnóstica. La disponibilidad de información acerca de nuevos alérgenos de *A. simplex* s.l. y/o de sus especies gemelas permitiría su uso en microarrays de proteínas. Sería necesario realizar estudios adicionales (fuera del alcance de la presente memoria) con sueros individualizados, con el fin de evaluar sus diferentes propiedades y validar su capacidad diagnóstica tales como, determinación de alérgenos principales, identificación de alérgenos responsables de reacciones cruzadas, reconocimiento diferencial asociado a diferentes formas clínicas, etc.

3. Caracterización molecular de los genes de los alérgenos Ani s 7 y Ani s 14

3.1 Alérgeno Ani s 7

El alérgeno Ani s 7, molécula ampliamente reconocida por pacientes con diferentes formas de anisakiosis, fue descrito parcialmente por Rodríguez *et al.* (2008). Su naturaleza repetitiva, con múltiples secuencias similares dispuestas en tándem y su alto contenido en cisteínas, la convirtieron en el primer alérgeno principal identificado de *A. simplex* con una estructura tan peculiar y única. Después otros autores determinaron la existencia de alérgenos de *Anisakis*, Ani s 12 y Ani s 14 (Kobayashi *et al.*, 2011, 2015), que aun presentando cierta similitud con Ani s 7, repeticiones y abundantes cisteínas, eran polipéptidos distintos. En este apartado de la discusión, se analizará las características de la secuencia completa del alérgeno Ani s 7 obtenida en el presente trabajo, tratando de establecer posibles relaciones con la alérgenicidad y las propiedades diagnósticas que la molécula exhibe.

Como ya se ha indicado, al estudiar Ani s 7 mediante diferentes abordajes bioinformáticos se encontró la molécula completa. Así, por ensamblaje de transcritos y comparación con otras secuencias deducidas, se caracterizó la secuencia CUFF.5600.1 con 316 residuos más en el extremo amino con respecto a la secuencia parcial descrita Ani s 7; en su búsqueda en la base Sanger, se encontró una secuencia de 1395 aminoácidos, ASIM_0001402501, con posible péptido señal, metionina inicial y codón de parada, considerada secuencia completa por sus propiedades y tras conseguir su clonación a partir de una colección de ADNc de larvas 3 del

parásito; con respecto a los datos de Baird *et al.*, 2016, también se localizó un transcrito de 1412 aminoácidos, con más del 99% de similitud con las moléculas citadas. En definitiva, gracias al abordaje “in silico” se dispuso de la secuencia completa de Ani s 7, con variantes que mostraban diferencias en su composición, especialmente inserciones/deleciones, según la opción elegida. Dichos cambios, así como algunas sustituciones, se encontraron igualmente cuando se realizó el clonaje, secuenciación y alineamiento de los diferentes fragmentos solapantes amplificados a partir del ADNc parasitario (D1/R1; D2/R2; D3/R3; D4/R4; D5/R5).

En conjunto, las variantes encontradas se podrían corresponder con distintas isoformas de Ani s 7, formas que ya se han descrito en otros alérgenos de *A. simplex*, como Ani s 8 (Kobayashi *et al.* (2007-b)) que mostró 32 ADNc homólogos, 23 que expresaron la isoforma 1 y 9 secuencias que codificaron de manera individual las diferentes isoformas 2 a 10; estas proteínas pueden producirse por expresión de genes diferentes o por un mismo gen por *splicing* alternativo. Este último mecanismo es utilizado ampliamente por nematodos y se ha estudiado en profundidad en *C. elegans* (Zahler *et al.*, 2005); en el caso de Ani s 7, algunas evidencias experimentales obtenidas en el presente trabajo sugerirían *splicing* alternativo como origen de las isoformas descritas, aunque sería necesario confirmar esta hipótesis, y no descartar tampoco la posible multiplicidad genética. También algunas de estas secuencias podrían considerarse posibles pseudogenes (Tutar, 2012), o bien proteínas diferentes de las tres especies gemelas del complejo *A. simplex* s.l. (*A. simplex* s.s., *A. pegreffii*, *A. berlandi*) y de sus híbridos (Abollo *et al.*, 2003), teniendo en cuenta la variabilidad genética entre estas poblaciones y que en ocasiones se utilizan conjuntamente, sin diferenciación especie-específica para el aislamiento de ácidos nucleicos, pudiendo afectar a la heterogeneidad molecular encontrada (Quiazon *et al.*, 2013).

La estructura de las secuencias aminoacídicas deducidas Ani s 7, reportadas en el trabajo, mantuvo la organización previamente descrita para la secuencia parcial del alérgeno (Rodríguez *et al.*, 2008), con cuatro cisteínas en cada repetición (CX₁₇₋₂₅CX₉₋₂₂CX₈CX₆), pero con mayor número de las mismas al tratarse de secuencias más largas de la molécula. La secuencia Ani s 7 de 1.437 aa presentó 24 unidades CX₁₇₋₂₅CX₉₋₂₂CX₈CX₆, con un extremo amino y carboxi no alineados y con la repetición 4, cerca del extremo amino, con características diferentes del resto de repeticiones, con un tramo interno CX₉₋₂₂ de mayor tamaño, formado por 60 residuos (posición 340 a la 380) y composición peculiar al contener numerosas prolínas y valinas en dicha región. En el caso de la secuencia Ani s 7 completa de 1578 aa, se distinguen 27 repeticiones, con distribución idéntica en tándem de las mismas con las cuatro cisteínas, extremos no alineados, y la repetición 7 con las mismas características a las descritas para la repetición 4 de la variante Ani s 7 de 1.437 aa.

En relación con esta estructura repetida encontrada en Ani s 7 hay que destacar que son múltiples las proteínas que presentan repeticiones aminoacídicas en su secuencia, especialmente en eucariotas (Luo y Nijveen, 2014). En general, Ani s 7 mostró repeticiones de tamaño variable, imperfectas o divergentes, con inserciones/deleciones en las diferentes unidades

establecidas. Algunos autores han sugerido que las repeticiones internas en proteínas se derivaban de eventos de recombinación/duplicación intragénica, al ser estrategias ventajosas utilizadas por los organismos vivos a lo largo de su evolución (Andrade *et al.*, 2001); así, las correspondientes estructuras terciarias, resultantes del ensamblaje de las múltiples repeticiones, determinarían la disponibilidad de una superficie de unión aumentada y la mejora de la función proteica. Estas consideraciones se podrían aplicar a Ani s 7, si bien no se pueden confirmar ya que en la actualidad no se dispone de material para llevar a cabo los estudios evolutivos necesarios y desconocemos la estructura terciaria y cuaternaria del alérgeno, al no tener moldes para proponer su posible organización y carecer de datos sobre su cristalización.

Otra de las características estructurales de la secuencia Ani s 7 es su alto contenido en residuos de cisteína, que se mantuvo a lo largo de las secuencias analizadas en el trabajo, y por extensión en el extremo amino clonado. Se han descrito repeticiones ricas en este aminoácido en otras moléculas no alérgicas, como la repetición 1 *Worm-specific* de ciertas proteínas de *C. elegans* y de otros eucariotas; dicha región contiene varias cisteínas conservadas que probablemente formen puentes disulfuro y que están asociadas habitualmente con dominios tipo Kunitz que pueden funcionar como inhibidores de serin proteasas (Tolkatchev *et al.*, 2000). En cualquier caso, no se encontraron homologías significativas con estos grupos de moléculas, por lo que se sugiere que no existe relación funcional de Ani s 7 con ellas.

Sí que se ha destacado en la literatura (Breiteneder y Mills, 2005), que en alérgenos es frecuente la presencia de puentes di-sulfuro y modificaciones post-traduccionales como la N-glicosilación, como otros mecanismos de estabilidad molecular; Ani s 7 presenta cerca de un 7% de residuos de cisteína, dispuestos a intervalos regulares, que facilitarían la formación de enlaces internos entre las repeticiones y posibles lugares de N-glicosilación, (NXS/T), reuniendo las características de otros alérgenos descritos. Esta organización característica podría estar relacionada con su función y sus propiedades alérgicas, aunque como se ha adelantado resulta difícil determinar la funcionalidad de la molécula en *A. simplex*, al no encontrarse homología con las moléculas (dominios, regiones) con actividad conocida depositadas en los bancos de datos.

Por otra parte, las repeticiones aminoácídicas son componentes característicos de alérgenos (Breiteneder y Mills, 2005), estructura que en general les confiere estabilidad térmica y resistencia a la proteólisis, incrementada por una disponibilidad aumentada de sitios de unión a ligandos variados como ya se ha sugerido más arriba (Luo y Nijveen, 2014). Para saber si Ani s 7 contenía posibles secuencias alérgicas, su buscó motivos descritos en alérgenos depositados en los diferentes bancos de datos, atendiendo a las guías propuestas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de Agricultura y Alimentos de las Naciones Unidas (FAO); de acuerdo a dichas instituciones, Ani s 7 presentaba por lo menos 7 repeticiones distintas de 6 aminoácidos contiguos, a lo largo de la secuencia, que eran idénticos a los de secuencias descritas en diferentes alérgenos (Rodríguez *et al.*, 2008), con lo que se cumplía una de las premisas fijadas por OMS/OAF para considerarle como posible alérgeno. Ahora bien, no se encontraron similitudes

de más del 35%, con cobertura de 80 residuos, al comparar Ani s 7 y otros alérgenos descritos (Pomés *et al.*, 1998; Pomés, 2002).

En relación con la alergenicidad de Ani s 7, además de las hipótesis derivadas de su estructura que sugieren propiedades alérgicas para la molécula, existen evidencias experimentales sobre su reconocimiento por inmunoglobulinas IgE específicas, típicas de algunas alergias. Así, se demostró que esta clase de anticuerpos, con expresión aumentada en la anisakiosis, y el mAb UA3, específico de Ani s 7, reconocían el mismo epitopo, ya que mediante ensayos de inhibición se determinó que sobre el 60% de las IgE generadas en anisakiosis reconocen también el epitopo UA3 sobre el alérgeno nativo Ani s 7 deglicosilado (Rodríguez *et al.*, 2008). Dada la relevancia de la observación, se buscó la posible secuencia consenso del epitopo específico para UA3, ya sugerida previamente, tanto en las secuencias teóricas de Ani s 7, obtenidas por abordajes bioinformáticos, o en la de los clones 1 y 2 amplificados; se concluyó que esta secuencia reactiva presentaba en la zona central una secuencia consenso “CXXKYGX(E)(F)CXK”, que era un péptido lineal con características similares al descrito en el trabajo de caracterización de parte de la molécula Ani s 7, con tripletes de aminoácidos, limitando su porción inicial y final, que también mantenían una cadencia repetitiva y con relevancia en su reconocimiento. La repeticiones del epitopo UA3 fueron numerosas en las moléculas analizadas (secuencia teórica, N=25; clon 1, N=25; clon 2, N=27), observación que pondría de manifiesto las propiedades alergénicas de la molécula y el interés de su uso para el diagnóstico de los síndromes alérgicos asociados con *A. simplex*. El análisis de las propiedades alérgicas de la molécula Ani s 7 se llevarán a cabo en el futuro, basándonos en la estructura de las repeticiones UA3, la naturaleza peptídica de estas repeticiones cortas y el empleo de ensayos de inhibición. Además se tiene que mencionar que la secuencia consenso “CXXKYGX(E)(F)CXK” también se encontró en otras secuencias parálogas de Ani s 7, y el alérgeno Ani s 14, caracterizados en el presente trabajo, con la repercusión que la alta repetición de la estructura consenso puede suponer en la amplificación de la respuesta generada; estas observaciones se discutirán más detenidamente en los siguientes apartados.

Por último, hay que comentar las posibles propiedades diagnósticas del alérgeno completo. Aunque no se han realizado ensayos “in vitro” con el correspondiente antígeno recombinante, que se tendrá que expresar en sistemas heterólogos en *E. coli*, se postula que con la información que se ha obtenido podremos diseñar nuevos recombinantes, o sintetizar péptidos, para mejorar, en lo posible, las propiedades diagnósticas del ensayo con Ani s 7, y para emplearlos como marcador de los diferentes síndromes reconocidos en anisakiosis, bien la molécula entera o sus truncados.

En este apartado, también se buscó el homólogo de Ani s 7 en el banco de datos de *A. pegreffii* publicado por Baird *et al.* (2016). Se apreciaron pequeñas diferencias entre las moléculas deducidas por los autores, siendo especialmente llamativo el resultado obtenido en la comparación de las secuencias con las deducidas para los clones 1 y 2 amplificados en el presente trabajo (ver tabla 21). Una explicación a las semejanzas y diferencias encontradas, podría resultar

del método de preparación de las genotecas utilizadas en el presente trabajo, mediante larvas 3 de *A. simplex* s.l., sin distinguir entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, por lo que analizaríamos simultáneamente poblaciones mezcladas de los parásitos y obtendríamos secuencias con parte de la estructura de las dos especies. Además el homólogo de Ani s 7 en *A. pegreffii* mantuvo la estructura del epitopo UA3, con secuencias similares y abundantes repeticiones, que apoyaría las propiedades alérgicas de la molécula en *A. pegreffii*, y sus propiedades diagnósticas en la identificación de la patología que ocasiona en las áreas geográficas en las que esta especie se localiza.

3.2 Parálogos del Ani s 7

En este caso se trataron de moléculas deducidas por abordajes “in silico”, que se vio que eran alérgenos con secuencias repetidas dispuestas en tándem, en las que las cisteínas era abundantes y ejes en el establecimiento de las repeticiones establecidas. Presentaban tamaños diferentes, estructura distinta y composición peculiar, con homologías bajas en coberturas pequeñas. El parálogo 1 tenía una unidad repetitiva con la estructura que se indica “CX₉₋₁₈CX₈CX₆CX₁₈₋₂”, el 2 “CX₉₋₂₆CX₇₋₈CX₆CX₂₁₋₃₀” y el 3 “CX₉CX₈CX₆CX₁₇₋₂₅”. Todos mostraron posibles lugares de N-glicosilación y en unos de ellos se identificó la secuencia consenso característica del epitopo UA3. Estas evidencias sugerirían su naturaleza alérgica, y su posible interés diagnóstico como nuevos alérgenos con posible uso como marcadores de las diferentes formas de la enfermedad.

3.3 Alérgeno Ani s 14

Molécula descrita parcialmente por Kobayashi *et al.* (2015), es un alérgeno mayor con una estructura común (CX₁₅₋₂₆CX₉₋₁₃CX₈CX₆), que había sido mencionado previamente por nuestro grupo (Rodríguez *et al.*, 2008), aunque sus características no se publicaron en su momento.

Por aproximaciones “in silico”, utilizando las secuencias de los bancos de datos producidos en el presente trabajo y las anotaciones de Baird *et al.* (2016), se consiguió obtener una secuencia de 4.494 nt, que se traduce en un polipéptido de 164, 78 kDa, carente de metionina inicial.

Las propiedades determinadas, junto con la observación de secuencias consenso similares a las indicadas para el epitopo UA3, apoyarían sus propiedades alérgicas junto con su interés diagnóstico al contar con secuencias repetidas y cros-reactivas con Ani s 7 (Rodríguez *et al.*, 2008), que en parte podrían incrementar la respuesta conseguida con el alérgeno Ani s 7, y además aportaría nuevas repeticiones alérgicas para permitir la generación de respuestas específicas y su utilización en la detección diferencial de las formas clínicas de anisakiosis.

También se encontraron secuencias homólogas de Ani s 14 en *A. pegreffii*, con pocos cambios, que como ya se ha comentado apoyaría las propiedades alérgicas de la molécula en *A.*

pegreffii, y sus propiedades diagnósticas en la identificación de las patologías que ocasiona en las áreas geográficas en las que esta especie se localiza.

CONCLUSIONES

1. La realización de dos ensamblados (ensamblado “de novo” y ensamblado “de novo” guiado por referencia) del transcriptoma MH de *A. simplex* s.l. y la combinación de sus resultados, aumenta la información final obtenida y genera *contigs* y transcritos de alta calidad.
2. La predicción de las proteínas de ES de *A. simplex* s.l. proporciona una herramienta complementaria para la búsqueda “in silico” de alergenitos putativos del parásito, mediante estudios de similitud con alergenitos descritos en las bases de datos públicas.
3. *A. simplex* s.l. posee tres disulfuro isomerasas (AT-3, AT-13 y AT-19) potencialmente alérgicas con diferencias estructurales (abb') (abb'a') (aa'b). Se postula que AT-3 es el alergenito inmunodominante propuesto por Fæste *et al.* (2014).
4. Los inhibidores de serin proteasas parecen tener un papel importante en los procesos alérgicos asociados a la infección por *Anisakis* spp. A los alergenitos ya caracterizados de este grupo (Ani s 1 y Ani s 6) habría que añadir los alergenitos predichos AT-3, AT-4 y AT-7.
5. Las proteasas, esenciales para el proceso de invasión de *A. simplex* s.l., podrían comportarse como alergenitos en la infección accidental en humanos. La hipótesis está apoyada por el hecho de que el 37% de los alergenitos predichos, en la presente memoria, pertenecen a esta clase de proteínas y además, por la identificación de dos proteasas (ATP-9 y ATP-6) reconocidas diferencialmente por pacientes aquejados de AGA, D y UC+.
6. Al menos 9 de los alergenitos predichos (disulfuro isomerasas, proteínas de choque térmico, proteínas del veneno de himenópteros y proteínas D7) podrían estar implicados en reacciones cruzadas, teniendo en cuenta la relación existente entre los componentes del clado Ecdysozoa (nematodos y artrópodos).
7. Se comprueba el reconocimiento diferenciado de alergenitos asociado con las distintas patologías clínicas relacionadas con la infección por *Anisakis* spp. (AGA, D, UC+).
8. El alergenito AT-10=ATP-1 (*Ani*-VAL1), con un dominio tipo SCP, es el alérgeno más inmunorreactivo en todos los grupos de pacientes alérgicos estudiados (AGA, D y UC+). Se propone como uno de los posibles alergenitos responsables de las reacciones alérgicas inducidas tras la infección por *A. simplex* s.l., y se plantea su posible papel en las reacciones cruzadas descritas entre *A. simplex* s.l. y el veneno de las avispas.
9. Se propone la existencia de una familia de proteínas alérgicas con similitud a las proteínas 22U-like, que pudiesen ser marcadores de infección activa temprana y de la que As22U y AT-4 serían dos miembros diferentes.
10. Los alergenitos ATP-1 a ATP-14, que estaban presentes en los productos de ES de cultivos de larvas 3 del complejo *A. simplex* s.l., se identificaron por reconocimiento de IgE específica de pacientes con diferentes patologías clínicas asociadas a la infección por *Anisakis* spp, lo que indicaría su potencial utilidad diagnóstica.

11. El análisis “in silico” y mediante clonación del alergeno principal Ani s 7 de *A. simplex* s.l. sugiere que Ani s 7 es un miembro de una familia multigénica, que incluye distintas copias de la molécula, así como genes parálogos (PAR-1, PAR-2, PAR-3). Además, el gen ortólogo en *A. pegreffii*, que muestra alta homología con Ani s 7, apoyaría el uso de cualquiera de estos polipéptidos como herramienta diagnóstica para los casos de los procesos alérgicos asociados a la infección por *A. simplex* s.l.
12. El estudio detallado de las secuencias de los alergenos Ani s 7 y Ani s 14 de *A. simplex* s.l. revela la presencia de múltiples potenciales epitopos de unión a IgE, relacionados con los procesos alérgicos que generan y que amplificarían sus propiedades diagnósticas.
13. La disponibilidad de una información detallada de las secuencias de los alergenos Ani s 7 y Ani s 14 permitirá la selección de las repeticiones más idóneas, la expresión como proteínas recombinantes para su uso, solas o combinadas, en el diagnóstico de los procesos alérgicos asociados a la infección por *A. simplex* s.l.

BIBLIOGRAFÍA

- Abollo E, Gestal C, Pascual S. *Anisakis* infestation in marine fish and cephalopods from Galician waters: an updated perspective. *Parasitol Res.* 2001;87(6):492-9.
- Abollo E, Paggi L, Pascual S, D'Amelio S. Occurrence of recombinant genotypes of *Anisakis simplex* s.s. and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in an area of sympatry. *Infect Genet Evol.* 2003;3(3):175-81.
- Adkinson NF. Measurement of total serum immunoglobulin E and allergen-specific immunoglobulin E antibody in: N.R. Rose, H. Friedman (Eds.). *Manual of Clinical Immunology* (2nd ed., Chap. 107), American Society for Microbiology; 1980. 794-807.
- Aguinaldo AM, Turbeville JM, Linford LS, Rivera MC, Garey JR, Raff RA, *et al.* Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature.* 1997;387(6632):489-93.
- Akao N, Yoshimura H. Latex agglutination test for immunodiagnosis of gastric anisakiasis. *In* H. Ishikura and M. Namiki (ed.). *Gastric anisakiasis in Japan. Epidemiology, diagnosis, treatment.* Springer- Verlag; 1989. 97-102.
- Akao N, Ohyama T, Kondo K. Immunoblot analysis of serum IgG, IgA and IgE responses against larval excretory-secretory antigens of *Anisakis simplex* in patients with gastric anisakiasis. *J Helminthol.* 1990;64(4):310-8.
- Aki T, Fujikawa A, Wada T, Jyo T, Shigeta S, Murooka Y, *et al.* Cloning and expression of cDNA coding for a new allergen from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*: homology with human heat shock cognate proteins in the heat shock protein 70 family. *J Biochem* 1994;115:435-40.
- Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. 2008 [29 Apr 2010; citado 15 Mar 2017]. <http://www.allergen.org/viewallergen.php?aid=73>
- Alonso A, Daschner A, Moreno-Ancillo A. Anaphylaxis with *Anisakis simplex* in the gastric mucosa. *N Engl J Med.* 1997;337(5):350-1.
- Alonso-Gómez A, Moreno-Ancillo A, López-Serrano MC, Suarez-de-Parga JM, Daschner A, Caballero MT, *et al.* *Anisakis simplex* only provokes allergic symptoms when the worm parasitises the gastrointestinal tract. *Parasitol Res.* 2004;93(5):378-84.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:3389-3402.
- Anadón AM, Romarís F, Escalante M, Rodríguez E, Gárate T, Cuéllar C, *et al.* The *Anisakis simplex* Ani s 7 major allergen as an indicator of true *Anisakis* infections. *Clin Exp Immunol.* 2009;156(3):471-8.
- Anadón AM, Rodríguez E, Gárate MT, Cuéllar C, Romarís F, Chivato T, *et al.* Diagnosing human anisakiasis: recombinant Ani s 1 and Ani s 7 allergens versus the UniCAP 100 fluorescence enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(4):496-502.

- Andrade MA, Perez-Iratxeta C, Ponting CP. Protein repeats: structures, functions, and evolution. *J Struct Biol.* 2001;134:117-31.
- Appleby D, Kapoor W, Karpf M, Williams S. Anisakiasis: nematode infestation producing small-bowel obstruction. *Arch Surg.* 1982;117(6):836.
- Arcos SC, Ciordia S, Roberston L, Zapico I, Jiménez-Ruiz Y, Gonzalez-Muñoz M, *et al.* Proteomic profiling and characterization of differential allergens in the nematodes *Anisakis simplex* sensu stricto and *A. pegreffii*. *Proteomics.* 2014;14(12):1547-68.
- Arenal Vera JJ, Marcos Rodríguez JL, Borrego Pintado MH, Bowakin Dib W, Castro Lorenzo J, Blanco Alvarez JI. Anisakiasis as a cause of acute appendicitis and rheumatologic picture: the first case in medical literature. *Rev Esp Enferm Dig.* 1991;79(5):355-8.
- Arizono N, Miura T, Yamada M, Tegoshi T, Onishi K. Human infection with *Pseudoterranova azarasi* roundworm. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(3):555-6.
- Arizono N, Yamada M, Tegoshi T, Yoshikawa M. *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii*: biological characteristics and pathogenetic potential in human anisakiasis. *Foodborne Pathog Dis.* 2012;9(6):517-21.
- Arlian LG, Morgan MS, Quirce S, Marañón F, Fernández-Caldas E. Characterization of allergens of *Anisakis simplex*. *Allergy.* 2003;58(12):1299-303.
- Arrieta I, del Barrio M, Vidarte L, del Pozo V, Pastor C, Gonzalez-Cabrero J, *et al.* Molecular cloning and characterization of an IgE-reactive protein from *Anisakis simplex*: Ani s 1. *Mol Biochem Parasitol.* 2000;107(2):263-8.
- Asami K, Watanuki T, Sakai H, Imano H, Okamoto R. Two cases of stomach granuloma caused by anisakis-like larval nematodes in japan. *Am J Trop Med Hyg.* 1965;14:119-23.
- Asojo OA, Goud G, Dhar K, Loukas A, Zhan B, Deumic V, *et al.* X-ray structure of Na-ASP-2, a pathogenesis-related-1 protein from the nematode parasite, *Necator americanus*, and a vaccine antigen for human hookworm infection. *J Mol Biol.* 2005;346(3):801-14.
- Asturias JA, Eraso E, Martínez A. Cloning and high level expression in *Escherichia coli* of an *Anisakis simplex* tropomyosin isoform. *Mol Biochem Parasitol.* 2000-a;108(2):263-7.
- Asturias JA, Eraso E, Moneo I, Martínez A. Is tropomyosin an allergen in *Anisakis*? *Allergy.* 2000-b;55(9):898-9.
- Audicana M, Fernández de Corres L, Muñoz D, Fernández E, Navarro JA, Del Pozo MD. Recurrent anaphylaxis due to *Anisakis simplex* parasitizing sea-fish. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995;96:558-560.
- Audicana MT, Ansotegui IJ, Fernández de Corres L, Kennedy MW. *Anisakis simplex*: dangerous—

- dead and alive?. Trends Parasitol. 2002;18:20-25.
- Audicana MT, Kennedy MW. *Anisakis simplex*: from Obscure Infectious Worm to Inducer of Immune Hypersensitivity. Clinical Microbiology Reviews. 2008;21(2): 360-379.
- Baird FJ, Su X, Aibinu I, Nolan MJ, Sugiyama H, Otranto D, *et al.* The *Anisakis* Transcriptome Provides a Resource for Fundamental and Applied Studies on Allergy-Causing Parasites. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2016;10(7): e0004845.
- Bao Pérez F, Alvarez Rubio M, Martí Cabané J. *Anisakis simplex* on an ulcer in a Billroth II patient. Rev Esp Enferm Dig. 2005;97(7):532-3.
- Barbuzza O, Guarneri F, Galtieri G, Gangemi S, Vaccaro M. Protein contact dermatitis and allergic asthma caused by *Anisakis simplex*. Contact Dermatitis. 2009;60(4):239-40.
- Ben-Achour Y, Chenik M, Louzir H, Dellagi K. Identification of a disulfide isomerase protein of *Leishmania major* as a putative virulence factor. Infect Immun. 2002;70(7):3576-85.
- Bendtsen JD, Nielsen H, Heijne GV, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. J. Mol. Biol. 2004-a; 340:783-795.
- Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N, Heijne GV, Brunak S. Feature based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. Protein Eng. Des. Sel. 2004-b; 17(4):349-356.
- Bertuccio O, Calabrò C, Galati P, Bertuccio C, Riario-Sforza GG, Incorvaia C. A case of suspected occupational asthma from exposure to *Anisakis simplex*. Med Lav. 2010;101(1):73-4.
- Bethony JM, Simon G, Diemert DJ, Parenti D, Desrosiers A, Schuck S, *et al.* Randomized, placebo-controlled, double-blind trial of the Na-ASP-2 hookworm vaccine in unexposed adults. Vaccine. 2008;26(19):2408-17.
- Bhargava D, Raman R, El Azzouni MZ, Bhargava K, Bhusnurmath B. Anisakiasis of the tonsils. J. Laryngol. Otol. 1996;110:387-388.
- Bier JW. Experimental anisakiasis: cultivation and temperature tolerance determinations. J. Milk Food Technol. 1976;39:132-137.
- Bier JW, Raybourne RB. *Anisakis simplex* (nematoda ascari-doidea): formation of immunogenic attachment caps in pigs. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 1988;55:91-94.
- Bischoff SC, de Weck AL, Dahinden CA. Interleukin 3 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor render human basophils responsive to low concentrations of complement component C3a. Proc Natl Acad Sci USA. 1990;87:6813-7.
- Boeckmann B, Bairoch A, Apweiler R, Blatter MC, Estreicher A, Gasteiger E, *et al.* The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. Nucleic Acids Res. 2003;31:365-370.

- Bohle B, Zwölfer B, Fischer GF, Seppälä U, Kinaciyan T, Bolwig C, *et al.* Characterization of the human T cell response to antigen 5 from *Vespula vulgaris* (Ves v 5). Clin Exp Allergy. 2005;35(3):367-73.
- Bouree P, Paugam A, Petithory JC. Anisakidosis: report of 25 cases and review of the literature. Comparative Immunology. Microbiology and Infectious Diseases. 1995;18:75-84.
- Breiteneder H, Mills EN. Molecular properties of food allergens. J Allergy Clin Immunol. 2005;115:14-23.
- Breiteneder H, Mills C. Structural bioinformatic approaches to understand cross-reactivity. Mol Nutr Food Res. 2006;50(7):628-32.
- Britton C, Moore J, Gilleard JS, Kennedy MW. Extensive diversity in repeat unit sequences of the cDNA encoding the polyprotein antigen/allergen from the bovine lungworm *Dictyocaulus viviparus*. Mol Biochem Parasitol. 1995;72(1-2):77-88.
- Buzzell GR, Sommerville RI. The structure of the oesoph- agus in the third-stage infective larva of *Anisakis* sp. (Nematoda: Anisakidae). Trans. Am. Microsc. Soc. 1985;104:86-94.
- Caballero ML, Moneo I. Specific IgE determination to Ani s 1, a major allergen from *Anisakis simplex*, is a useful tool for diagnosis. Ann Allergy Asthma Immunol. 2002;89(1):74-77.
- Caballero ML, Moneo I, Gómez-Aguado F, Corcuera MT, Casado I, Rodríguez-Pérez R. Isolation of Ani s 5, an excretory–secretory and highly heat-resistant allergen useful for the diagnosis of *Anisakis* larvae sensitization. Parasitol Res. 2008;103(5): 1231.
- Caballero ML, Umpierrez A, Moneo I, Rodríguez-Pérez R. Ani s 10, a new *Anisakis simplex* allergen: cloning and heterologous expression. Parasitol Int. 2011;60(2): 209-212.
- Caballero ML, Umpierrez A, Perez-Piñar T, Moneo I, de Burgos C, Asturias JA, *et al.* *Anisakis simplex* recombinant allergens increase diagnosi specificity preserving high sensitivity. Int Arch Allergy Immunol. 2012;158(3):232-40.
- Caballero ML, Asero R, Antonicelli L, Kamberi E, Colangelo C, Fazii P, *et al.* *Anisakis* allergy component-resolved diagnosis: clinical and immunologic differences between patients from Italy and Spain. Int Arch Allergy Immunol. 2013;162(1):39-44.
- Cancrini G, Magro G, Giannone G. 1st case of extra-gastrointestinal anisakiasis in a human diagnosed in Italy. Parassitologia. 1997;39:13-7.
- Cappello M, Vlasuk GP, Bergum PW, Huang S, Hotez PJ. *Ancylostoma caninum* anticoagulant peptide: a hookworm-derived inhibitor of human coagulation factor Xa. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(13):6152-6.
- Carballeda-Sangiao N, Rodríguez-Mahillo AI, Careche M, Navas A, Moneo I, González-Muñoz M.

- Changes over Time in IgE Sensitization to Allergens of the Fish Parasite *Anisakis* spp. PLoS Negl Trop Dis. 2016-a;10(7):e0004864.
- Carballeda-Sangiao N, Rodríguez-Mahillo AI, Careche M, Navas A, Caballero T, Dominguez-Ortega J, *et al.* Ani s 11-Like Protein Is a Pepsin- and Heat-Resistant Major Allergen of *Anisakis* spp. and a Valuable Tool for *Anisakis* Allergy Component-Resolved Diagnosis. Int Arch Allergy Immunol. 2016-b;169(2):108-12.
- Castán B, Borda F, Iñarrairaegui M, Pastor G, Vila J, Zozaya JM. Anisakiasis digestiva: clínica y diagnóstico según la localización. Rev Esp Enferm Dig. 2002;94:463-7.
- Cavallero S, Nadler SA, Paggi L, Barros NB, D'Amelio S. Molecular characterization and phylogeny of anisakid nematodes from cetaceans from southeastern Atlantic coasts of USA, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. Parasitol Res. 2011;108(4):781-792.
- Cavallero S, Ligas A, Bruschi F, D'Amelio S. Molecular identification of *Anisakis* spp. from fishes collected in the Tyrrhenian Sea (NW Mediterranean). Vet Parasitol. 2012;187(3-4):563-6.
- Céspedes M, Saez A, Rodríguez I, Pinto JM, Rodríguez R. Chronic anisakiasis presenting as a mesenteric mass. Abdominal Imaging. 2000;25(5):548.
- Chen HY, Cheng YS, Grabner DS, Chang SH, Shih HH. Effect of different temperatures on the expression of the newly characterized heat shock protein 90 (Hsp90) in L3 of *Anisakis* spp. isolated from *Scomber australasicus*. Vet Parasitol. 2014;205(3-4):540-50.
- Chen HY, Cheng YS, Shih HH. Expression patterns and structural modelling of Hsp70 and Hsp90 in a fish-borne zoonotic nematode *Anisakis pegreffii*. Vet Parasitol. 2015;212(3-4):281-91.
- Chen Q, Zhang H, Song HQ, Yu HQ, Lin RQ, Zhu XQ. Prevalence of anisakid larvae in maricultured sea fish sold in Guangzhou. Journal of Animal and Veterinary Advances. 2008;7(9):1078-1080.
- Cheng M, Yang X, Li Z, He H, Qu Z, He A, *et al.* Cloning and characterization of a novel cathepsin B-like cysteine proteinase from *Angiostrongylus cantonensis*. Parasitol Res. 2012;110(6):2413-22.
- Chiung YM, Lin BL, Yeh CH, Lin CY. Heat shock protein (hsp 70)-related epitopes are common allergenic determinants for barley and corn antigens. Electrophoresis. 2000;21(2):297-300.
- Choi SJ, Lee JC, Kim MJ, Hur GY, Shin SY, Park HS. The clinical characteristics of *Anisakis* allergy in Korea. Kor. J. Intern. Med. 2009;24:160-163.
- Chuang JG, Su SN, Chiang BL, Lee HJ, Chow LP. Proteome mining for novel IgE-binding proteins from the German cockroach (*Blattella germanica*) and allergen profiling of patients. Proteomics 2010;10:3854-67.
- Chung YB, Lee J. Clinical characteristics of gastroallergic anisakiasis and diagnostic implications of

- immunologic tests. *Allergy, Asthma and Immunology Research*. 2014;6(3):228-233.
- Conesa A, Götz S, García-Gómez J, Terol J, Talón M, Robles M. Blast2go: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*. 2005;21:3674-3676.
- Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res*. 1988;16(22):10881-10890.
- Couture C, Measures L, Gagnon J, Desbiens C. Human intestinal anisakiosis due to consumption of raw salmon. *Am J Surg Pathol*. 2003;27:1167-1172.
- Corvo I, O'Donoghue AJ, Pastro L, Pi-Denis N, Eroy-Reveles A, Roche L, *et al*. Dissecting the active site of the collagenolytic cathepsin L3 protease of the invasive stage of *Fasciola hepatica*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(7):e2269.
- Cuéllar C, Daschner A, Valls A, De Frutos C, Fernández-Fígares V, Anadón AM, *et al*. Anis 1 and Anis 7 recombinant allergens are able to differentiate distinct *Anisakis simplex*-associated allergic clinical disorders. *Arch Dermatol Res*. 2012;304(4): 283-288.
- Dahinden CA, Kurimoto Y, De Weck AL, Lindley I, Dewald B, Baggiolini M. The neutrophil-activating peptide NAF/NAP-1 induces histamine and leukotriene release by interleukin 3-primed basophils. *J. Exp. Med*. 1989;170:1787.
- Dahinden CA, Bischoff SC, Brunner T, Krieger M, Takafuji S, de Weck AL. Regulation of mediator release by human basophils: importance of the sequence and time of addition in the combined action of different agonists. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1991;94:161-164.
- Dalton JP, Neill SO, Stack C, Collins P, Walshe A, Sekiya M, *et al*. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int J Parasitol*. 2003;33(11):1173-81.
- Daschner A, Alonso-Gómez A, Caballero T, Barranco P, Suárez De Parga JM, López Serrano MC, *et al*. Gastric anisakiasis: an underestimated cause of acute urticaria and angioedema. *Br J Dermatol*. 1998;139:822-828.
- Daschner A, De Frutos C, Valls A, Vega F. *Anisakis simplex* sensitization-associated urticaria: short-lived immediate type or prolonged acute urticaria. *Arch Dermatol Res*. 2010;302(8):625-9.
- Daschner A, Fernández-Fígares V, Rodero M, Valls A, De Frutos C, Ubeira FM, *et al*. Specific IgG4: possible role in the pathogenesis and a new marker in the diagnosis of *Anisakis*-associated allergic disease. *Scand J Immunol*. 2014;79(2):120-6.
- Daschner A, González-Fernández J, Valls A, de Frutos C, Rodero M, Cuéllar C. Diamine oxidase levels in different chronic urticaria phenotypes. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2015;43(6):593-600.

- Deardorff TL, Jones RE, and Kayes SG. Adherence of eosinophils to the epicuticle of infective juveniles of *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae). J. Helminthol. Soc. Wash. 1991;58:131-137.
- De la Torre R, Pérez J, Hernández M, Jurado R, Martínez A, Morales E. Anisakiasis en pescados comercializados en el norte de Córdoba. Rev Esp Salud Pub. 2000;74:517-26.
- Del Carmen Romero M, Valero A, Navarro-Moll MC, Martín-Sánchez J. Experimental comparison of pathogenic potential of two sibling species *Anisakis simplex* s.s. and *Anisakis pegreffii* in Wistar rat. Trop Med Int Health. 2013;18(8):979-84.
- Delcroix M, Sajid M, Caffrey CR, Lim KC, Dvorák J, Hsieh I, *et al.* A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by platyhelminth parasite. J Biol Chem. 2006;281:39316-29.
- Del Pozo MD, Moneo I, de Corres LF, Audicana MT, Muñoz D, Fernandez E, *et al.* Laboratory determinations in *Anisakis simplex* allergy. J Allergy Clin Immunol. 1996;97(4):977-84.
- Del Rey Moreno A, Valero A, Mayorga C, Gómez B, Torres MJ, Hernández J, *et al.* Sensitisation to *Anisakis simplex* s.l. in a healthy population. Acta Trop. 2006;97:265-9.
- Del Rey-Moreno A, Valero-López A, Gómez-Pozo B, Mayorga-Mayorga C, Hernández-Quero J, Garrido-Torres-Puchol ML, *et al.* Usefulness of anamnesis and immunological techniques in the diagnosis of anisakidosis in patients with acute abdomen. Rev. esp. enferm. dig. 2008;100(3):146-152.
- Demoly P, Bousquet J, Manderscheid JC, Dreborg S, Dhivert H, Michel FB. Precision of skin prick and puncture tests with nine methods. J. Allergy Clin Immunol. 1991;88:758-62.
- Demoly P, Lebel B, Arnoux B. Allergen-induced mediator release tests. Allergy. 2003;58:553-8.
- Derewenda U, Li J, Derewenda Z, Dauter Z, Mueller G, Rule G, *et al.* The crystal structure of a major dust mite allergen *Der p 2*, and its biological implications. J. Mol. Biol. 2002;318:189-197.
- Desowitz RS, Raybourne RB, Ishikura H, Kliks MM. The radioallergosorbent test (RAST) for the serological diagnosis of human anisakiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1985;79(2):256-259.
- Diaz A, Allen J.E. Mapping immune response profiles: The emerging scenario from helminth immunology Eur. J. Immunol. 2007;37:3319-3326.
- Diemert DJ, Pinto AG, Freire J, Jariwala A, Santiago H, Hamilton RG, *et al.* Generalized urticaria induced by the Na-ASP-2 hookworm vaccine: implications for the development of vaccines against helminths. J Allergy Clin Immunol. 2012;130(1):169-76.e6.
- Donnelly S, Dalton JP, Loukas A. Proteases in helminth- and allergen- induced inflammatory responses. Chem Immunol Allergy. 2006;90:45-64.

- Dutta R, Inouye M. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. Trends Biochem Sci. 2000;25(1):24-8. Review.
- Elsik CG, Worley KC, Bennett AK, Beye M, Camara F, Childers CP, *et al.* Finding the missing honey bee genes: lessons learned from a genome upgrade. BMC Genomics. 2014;15:86.
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, Heijne GV. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. J. Mol. Biol. 2000; 300: 1005-1016.
- Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry. 1971;8:871-4.
- Fabresse FX, Essioux H, Meiran M, Larroque P, Celton H. Polyarthrite de l'anisakiase. Première cas. Press Med. 1984;13:1004-1008.
- Falcone FH, Tetteh KK, Hunt P, Blaxter ML, Loukas A, Maizels RM. The new subfamily of cathepsin-Z-like protease genes includes Tc-cpz-1, a cysteine protease gene expressed in *Toxocara canis* adults and infective larvae. Exp. Parasitol. 2000;94:201-207.
- Falcone FH, Loukas A, Quinnell RJ, Pritchard DI. The innate allergenicity of helminth parasites. Clin Rev Allergy Immunol. 2004;26:61-72.
- Fast NM, Xue L, Bingham S, Keeling PJ. Re-examining alveolate evolution using multiple protein molecular phylogenies. J. Eukaryot. Microbiol. 2002;49:30-37.
- Fæste CK, Jonscher KR, Dooper MM, Egge-Jacobsen WB, Moen A, Daschner A, *et al.* Characterisation of potential novel allergens in the fish parasite *Anisakis simplex*. EuPA Open Proteomics. 2014;4:140-155.
- Fernández de Corres L, Del Pozo MD, Aizpuru F. Prevalencia de sensibilización a *Anisakis simplex* en tres áreas españolas, en relación a las distintas tasas de consumo de pescado. Relevancia de la alergia a *Anisakis simplex*. Alergol Inmunol Clin. 2001;16:337-46.
- Fiers MWEJ, Gijs KA, Nijland H. Allermatch TM, a webtool for the prediction of potential allergenicity according to current FAO/WHO Codex alimentarius guidelines. BMC Bioinformatics. 2004;5:133.
- Fitzsimmons CM, Jones FM, Pinot de Moira A, Protasio AV, Khalife J, Dickinson HA, *et al.* Progressive cross-reactivity in IgE responses: an explanation for the slow development of human immunity to schistosomiasis? Infect Immun. 2012;80:4264-70.
- Fitzsimmons CM, Falcone FH, Dunne DW. Helminth Allergens, Parasite-Specific IgE, and Its Protective Role in Human Immunity. Front Immunol. 2014;5:61.
- Florent I, Mouray E, Dali Ali F, Drobecq H, Girault S, Schrével J, *et al.* Cloning of *Plasmodium falciparum* protein disulfide isomerase homologue by affinity purification using the

- antiplasmodial inhibitor 1,4-bis[3-[N-(cyclohexyl methyl)amino]propyl]piperazine. FEBS Lett. 2000;484(3):246-52.
- Francis SE, Gluzman IY, Oksman A, Knickerbocker A, Mueller R, Bryant ML, Sherman DR, Russell DG, Goldberg DE. Molecular characterization and inhibition of a *Plasmodium falciparum* aspartic hemoglobinase. EMBO J. 1994;13(2):306-317.
- Frank GR, Wisniewski N, Brandt KS, Carter CR, Jennings NS, Selkirk ME. Molecular cloning of the 22-24 kDa excretory-secretory 22U protein of *Dirofilaria immitis* and other filarial nematode parasites. Mol Biochem Parasitol. 1999;98(2):297-302.
- Frick M, Müller S, Bantleon F, Huss-Marp J, Lidholm J, Spillner E, *et al.* rApi m 3 and rApi m 10 improve detection of honey bee sensitization in Hymenoptera venom-allergic patients with double sensitization to honey bee and yellow jacket venom. Allergy. 2015;70(12):1665-8.
- Fujiwara RT, Bethony J, Bueno LL, Wang Y, Ahn SY, Samuel A, *et al.* Immunogenicity of the hookworm Na-ASP-2 vaccine candidate: characterization of humoral and cellular responses after vaccination in the Sprague Dawley rat. Hum Vaccin. 2005;1(3):123-8.
- Gamble HR, Purcell JP, Fetterer RH. Purification of a 44 kilodalton protease which mediates the ecdysis of infective *Haemonchus contortus* larvae. Mol Biochem Parasitol. 1989;33(1):49-58.
- Gane P, Pecquet C, Crespeau H, Lambin P, Abuaf N, Leynadier F. Flow cytometric evaluation of human basophils. Cytometry. 1993;14:344-348.
- García M, Moneo I, Audicana MT, del Pozo MD, Muñoz D, Fernández E, *et al.* The use of IgE immunoblotting as a diagnostic tool in *Anisakis simplex* allergy. J Allergy Clin Immunol. 1997;99(4):497-501.
- Garcia Alonso M, Caballero ML, Umpierrez A, Lluch-Bernal M, Knaute T, Rodríguez-Pérez R. Relationships between T cell and IgE/IgG4 epitopes of the *Anisakis simplex* major allergen Ani s 1. Clin Exp Allergy. 2015;45(5):994-1005.
- García-Mayoral MF, Treviño MA, Pérez-Piñar T, Caballero ML, Knaute T, Umpierrez A, *et al.* Relationships between IgE/IgG4 epitopes, structure and function in *Anisakis simplex* Ani s 5, a member of the SXP/RAL-2 protein family. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(3):e2735.
- García-Pérez JC, Rodríguez-Pérez R, Ballester A, Zuloaga J, Fernández-Puntero B, Arias-Díaz J, *et al.* Previous exposure to the fish parasite *Anisakis* as a potential risk factor for gastric or colon adenocarcinoma. Medicine. 2015;94(40):e1699.
- Garg G, Ranganathan S. In silico secretome analysis approach for next generation sequencing transcriptomic data. BMC Genomics. 2011;12(Suppl 3):S14.
- Gasser RB, Monti RJ. Identification of parasitic nematodes by PCR-SSCP of ITS-2 rDNA. Molecular and Cellular Probes. 1997;11:201-209.

- Goldberg DE, Slater AF, Beavis R, Chait B, Cerami A, Henderson GB. Hemoglobin degradation in the human malaria pathogen *Plasmodium falciparum*: a catabolic pathway initiated by a specific aspartic protease. *J. Exp. Med.* 1991;173(4):961-969.
- Gómez-Aguado F, Picazo A, Caballero ML, Moneo I, Asturias JA, Corcuera MT, *et al.* Ultrastructural localization of Ani s 1, a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Parasitol Res.* 2003;89(5):379-380.
- Gómez-Mateos M, Valero A, Morales-Yuste M, Martín-Sánchez J. Molecular epidemiology and risk factors for *Anisakis simplex s.l.* infection in blue whiting (*Micromesistius poutassou*) in a confluence zone of the Atlantic and Mediterranean: Differences between *A. simplex s.s.* and *A. pegreffii*. *Int J Food Microbiol.* 2016;232:111-6.
- González-Amores Y, Clavijo-Frutos E, Salas-Casanova C, Alcain-Martínez G. Direct parasitological diagnosis of infection with *Hysterothylacium aduncum* in a patient with epigastralgia. *Rev Esp Enferm Dig.* 2015;107(11):699-700.
- González-Fernández J, Daschner A, Nieuwenhuizen NE, Lopata AL, Frutos CD, Valls A, *et al.* Haemoglobin, a new major allergen of *Anisakis simplex*. *Int J Parasitol.* 2015;45(6):399-407.
- González-Muñoz M, Luque R, Nauwelaers F, Moneo I. Detection of *Anisakis simplex*-induced basophil activation by flow cytometry. *Cytometry Part B.* 2005;68B:31-36.
- Goodman RE. Performing IgE serum testing due to informatic matches in the allergenicity assessment of GM crops. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:S24-S34.
- Goud GN, Bottazzi ME, Zhan B, Mendez S, Deumic V, Plieskatt J, *et al.* Expression of the *Necator americanus* hookworm larval antigen Na-ASP-2 in *Pichia pastoris* and purification of the recombinant protein for use in human clinical trials. *Vaccine.* 2005;23(39):4754-64.
- Guarneri F, Guarneri C, Benvenga S. Cross-reactivity of *Anisakis simplex*: possible role of Ani s 2 and Ani s 3. *Int J Dermatol.* 2007;46(2):146-150.
- Hamada Y, Nagashima Y, Shiomi K. Identification of collagen as a new fish allergen. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001;65:285e91.
- Hanahan D. Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol Biol.* 1983;166:557-580.
- Herbert CA, King CM, Ring PC, Holgate ST, Stewart GA, Thompson PJ, *et al.* Augmentation of permeability in the bronchial epithelium by the house dust mite allergen Der p1. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995;12:369-78.
- Herranz-Bachiller M^aT, Atienza-Sánchez R, Barrio-Andrés J, Alcaide-Suárez N, Ruiz-Zorrilla R, Sancho-del-Valle L, *et al.* Colonic polyp secondary to *Anisakis simplex*. *Rev. esp. enferm. dig.* 2012;104(10):554-555.

- Hindley J, Wünschmann S, Satinover SM, Woodfolk JA, Chew FT, Chapman MD, *et al.* Bla g 6: a troponin C allergen from *Blattella germanica* with IgE binding calcium dependence. J Allergy Clin Immunol. 2006;117(6):1389-95.
- Hochberg NS, Hamer DH. Anisakidosis: perils of the deep. Clin. Infect. Dis. 2010;51:806-812.
- Hoffmann KF, Strand M. Molecular characterization of a 20.8-kDa *Schistosoma mansoni* antigen. Sequence similarity to tegumental associated antigens and dynein light chains. J Biol Chem. 1997;272(23):14509-15.
- Hong BX, Soong L. Identification and enzymatic activities of four protein disulfide isomerase (PDI) isoforms of *Leishmania amazonensis*. Parasitol Res. 2008;102(3):437-46.
- Hotez P, Cappello M, Hawdon J, Beckers C, Sakanari J. Hyaluronidases of the gastrointestinal invasive nematodes *Ancylostoma caninum* and *Anisakis simplex*: possible functions in the pathogenesis of human zoonoses. J. Infect. Dis. 1994;170:918-926.
- Howe KL, Bolt BJ, Shafie M, Kersey P, Berriman M. WormBase ParaSite - a comprehensive resource for helminth genomics. Mol Biochem Parasitol. 2016-a.
- Howe KL, Bolt BJ, Cain S, Chan J, Chen WJ, Davis P, *et al.* WormBase 2016: expanding to enable helminth genomic research. Nucleic Acids Res. 2016-b;44(D1):D774-80.
- Huang WY. Anisakids and human anisakiasis. 2. Investigation of the anisakids of commercial fish in the district of Paris. Ann Parasitol Hum Comp. 1988;63(3):197-208.
- Huang X, Madan A. CAP3: a DNA sequence assembly program. Genome Res. 1999;9:868-877.
- Ikura M. Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. Trends Biochem Sci. 1996;21(1):14-7.
- Ishiguro A, Uno Y, Ishiguro Y, Sakuraba H, Munakata A. Anisakiasis of the ileocecal valve. Gastrointest Endosc. 2001;53:677-9.
- Ishikura H, Kikuchi Y, Tokoyawa O, Hayasaka H, Kikuchi K. Skin (intradermal) testing using several kinds of *Anisakis* larva antigens. In H. Ishikura and K. Kikuchi (ed.), Intestinal anisakiasis in Japan. Infected fish, sero-immunological diagnosis, and prevention. Tokyo, Japan: Springer-Verlag; 1990. 159-165.
- Ishikura H, Kikuchi K, Nagasawa K, Ooiwa T, Takamiya H, Sato N, *et al.* Anisakidae and anisakidosis. In: Sun, T. (Ed.), Progress in Clinical Parasitology. Vol. 3. Springer-Verlag; 1993. 43-102.
- Ito Y, Ikematsu Y, Yuzawa H, Nishiwaki Y, Kida H, Waki S, *et al.* Chronic gastric anisakiasis presenting as pneumoperitoneum. Asian J Surg. 2007;30(1):67-71.
- Ivanciuc O, Schein C H, Braun W. Data Mining of Sequences and 3D Structures of Allergenic Proteins. Bioinformatics. 2002;18(10):1358-1364.

- Ivanciuc O, Schein C H, Braun W. SDAP: Database and Computational Tools for Allergenic Proteins. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(1):359-362.
- Iwasaki K, Torisu M. *Anisakis* and eosinophil. II. Eosinophilic phlegmon experimentally induced in normal rabbits by parasite-derived eosinophil chemotactic factor (ECF-P). *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1982;23:593-605.
- Janzen DH. *Evolution.* 1980; 34 (3):611-612.
- Jeon CH, Kim JH. Pathogenic potential of two sibling species, *Anisakis simplex* (s.s.) and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae): *in vitro* and *in vivo* studies. *Biomed Res Int.* 2015;2015:983656.
- Jin X, Deng L, Li H, Zhang Z, He Q, Yang C, *et al.* Identification and characterization of a serine protease inhibitor with two trypsin inhibitor-like domains from the human hookworm *Ancylostoma duodenale*. *Parasitol. Res.* 2011;108:287-295.
- Johannessen BR, Skov LK, Kastrup JS, Kristensen O, Bolwig C, Larsen JN, *et al.* Structure of the house dust mite allergen *Der f 2*: implications for function and molecular basis of IgE cross-reactivity. *FEBS Lett.* 2005;579(5):1208-12.
- Johansson E, Aponno M, Lundberg M, van Hage-Hamsten M. Allergenic cross-reactivity between the nematode *Anisakis simplex* and the dust mites *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Allergy.* 2001;56(7):660-6.
- Jones BF, Hotez PJ. Molecular cloning and characterization of Ac-mep-1, a developmentally regulated gut luminal metalloendopeptidase from adult *Ancylostoma caninum* hookworms. *Mol Biochem Parasitol.* 2002;119(1):107-16.
- Jones JT, Kumar A, Pylypenko LA, Thirugnanasambandam A, Castelli L, Chapman S, *et al.* Identification and functional characterization of effectors in expressed sequence tags from various life cycle stages of the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Mol Plant Pathol.* 2009;10(6):815-28.
- Kakizoe S, Kakizoe H, Kakizoe K, Kakizoe Y, Maruta M, Kakizoe T, *et al.* Endoscopic findings and clinical manifestation of gastric anisakiasis. *Am J Gastroenterol.* 1995;90:761-3.
- Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, Tanabe M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:109-114.
- Kanisawa Y, Kawanishi N, Hisai H, Araya H. Colonic anisakiasis: an unusual cause of intussusception. *Endoscopy.* 2000;32(9):S55.
- Kassai T, Cordero del Campillo M, Euzeby J, Gaafar S, Hiepe T, Himonas CA. Standardized nomenclature of animal parasitic diseases (SNOAPAD). *Vet Parasitol.* 1988;29(4):299-326.

- Kasuya S, Hamano H, Izumi S. Mackerel-induced urticaria and *Anisakis*. Lancet. 1990;335(8690):665.
- Kasuya S, Koga K. Significance of detection of specific IgE in *Anisakis*-related diseases. Arerugi. 1992;41:106-110.
- Kennedy MW, Tierney J, Ye P, McMonagle FA, McIntosh A, McLaughlin D, *et al*. The secreted and somatic antigens of the third stage larva of *Anisakis simplex*, and antigenic relationship with *Ascaris suum*, *Ascaris lumbricoides*, and *Toxocara canis*. Mol. Biochem. Parasitol. 1988;31:35-46.
- Kennedy MW. The nematode polyprotein allergens/antigens. Parasitology Today. 2000; 16:373–380.
- Kennedy MW. The polyprotein allergens of nematodes (NPAs) - structure at last, but still mysterious. Exp Parasitol. 2011;129(2):81-4.
- Kim LS, Lee YH, Kim S, Park HR, Cho SY. A case of anisakiasis causing intestinal obstruction. Kisaengchunghak Chapchi. 1991;29:93-96.
- Kim HJ, Park C, Cho SY. A case of extragastrointestinal anisakiasis involving a mesocolic lymph node. Korean J Parasitol. 1997;35(1):63-66.
- Kim JS, Kim KH, Cho S, Park HY, Cho SW, Kim YT, *et al*. Immunochemical and biological analysis of allergenicity with excretory-secretory products of *Anisakis simplex* third stage larva. Int Arch Allergy Immunol. 2005;136(4):320-8.
- Kinoshita Y, Fujimoto K, Lee M, Shinohara R, Kobayashi Y, Kawana S, *et al*. Two cases of allergies due to *Anisakis simplex*, positive to specific IgE for Ani s 12 allergen. Arerugi. 2014;63(10):1348-52.
- Knol EF, Koendeman L, Mul FP, Verhoeven AJ, Roos D. Differential activation of human basophils by anti-IgE and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. Indications for protein kinase C-dependent and independent activation pathways. Eur J Immunol. 1991;21:881-885
- Køie M. Experimental infections of copepods and sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* with small ensheathed and large third-stage larvae of *Anisakis simplex* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). Parasitol Res. 2001;87(1):32-6.
- Kobayashi Y, Ishizaki S, Shimakura K, Nagashima Y, Shiomi K. Molecular cloning and expression of two new allergens from *Anisakis simplex*. Parasitol Res. 2007-a;100:1233-41.
- Kobayashi Y, Shimakura K, Ishizaki S, Nagashima Y, Shiomi K. Purification and cDNA cloning of a new heat-stable allergen from *Anisakis simplex*. Mol Biochem Parasitol. 2007-b;155(2):138-145.

- Kobayashi Y, Ishizaki S, Nagashima Y, Shiomi K. Ani s 1, the major allergen of *Anisakis simplex*: Purification by affinity chromatography and functional expression in *Escherichia coli*. *Parasitology international*, 2008;57:314-319.
- Kobayashi Y, Ikeda K, Shiomi K. Elucidation of IgE-binding epitopes of Ani s 1: the major *Anisakis simplex* allergen. *Mol Biochem Parasitol*. 2010;174(2):128-31
- Kobayashi Y, Ohsaki K, Ikeda K, Kakemoto S, Ishizaki S, Shimakura K, *et al*. Identification of novel three allergens from *Anisakis simplex* by chemiluminescent immunoscreening of an expression cDNA library. *Parasitol Int*. 2011;60(2):144-150.
- Kobayashi Y, Kakemoto S, Shimakura K, Shiomi K. Molecular Cloning and Expression of a New Major Allergen, Ani s 14, from *Anisakis simplex*. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 2015;56(5):194-9.
- Kongkerd N, Uparanukraw P, Morakote N, Sajid M, McKerrow JH. Identification and characterization of a cathepsin L-like cysteine protease from *Gnathostoma spinigerum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2008;160(2):129-37.
- Koyama T, Kobayashi A, Kumada M, Komiya Y. Morphological and taxonomical studies on Anisakinae larvae found in marine fishes and squids. *Jpn. J. Parasitol*. 1969;18, 466-487.
- Kozlov G, Määttänen P, Thomas DY, Gehring K. A structural overview of the PDI family of proteins. *FEBS J*. 2010;277(19):3924-36.
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: Application to complete genomes. *J Mol Biol*. 2001;305(3):567-580.
- Kühnl J, Bobik T, Procter JB, Burmeister C, Höppner J, Wilde I, *et al*. Functional analysis of the methylmalonyl-CoA epimerase from *Caenorhabditis elegans*. *FEBS J*. 2005;272(6):1465-77.
- Kurimoto Y, De Weck AL, Dahinden CA. The effect of interleukin 3 upon IgE-dependent and IgE-independent basophil degranulation and leukotriene generation. *Eur J Immunol*. 1991;21:361-8.
- Kwak SY, Yoon YH. Laryngeal anisakiasis: an unusual cause of foreign-body sensation in the throat. *Otolaryngol. Head Neck Surg*. 2012;147:588-589.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.
- Lauer I, Miguel-Moncin MS, Abel T, Foetisch K, Hartz C, Fortunato D, *et al*. Identification of a plane pollen lipid transfer protein (Pla a 3) and its immunological relation to the peach lipid-transfer protein, Pru p 3. *Clin Exp Allergy*. 2007;37(2):261-9.
- Lequin RM. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*. 2005;51(12):2415-2418.

- Lin AH, Nepstad I, Florvaag E, Egaas E, Van Do T. An extended study of seroprevalence of anti-*Anisakis simplex* IgE antibodies in Norwegian blood donors. *Scand J Immunol*. 2014;79:61-7.
- Lindqvist Y, Schneider G, Vihko P. Three-dimensional structure of rat acid phosphatase in complex with L (+)-tartrate. *J Biol Chem*. 1993; 268: 20744–20746.
- Long Y, Cao B, Yu L, Tukayo M, Feng C, Wang Y, Luo D. *Angiostrongylus cantonensis* cathepsin B-like protease (Ac-cathB-1) is involved in host gut penetration. *Parasite*. 2015;22:37.
- López I, Pardo MA. A phage display system for the identification of novel *Anisakis simplex* antigens. *J Immunol Methods*. 2011;373:247-51.
- López D, Ramírez LM, Del Rosal R, López F, Fernández-Crehuet R, Miño G. Anisakiasis en España: una enfermedad creciente. Revisión. *Gastroenterol Hepatol*. 2000; 23:307-11.
- López-Serrano MC, Alonso-Gómez A, Moreno-Ancillo A, Daschner A, Suárez de Parga J. Anisakiasis gastro-alérgica: Hipersensibilidad inmediata debida a parasitación por *Anisakis simplex*. *Alergol Inmunol Clin*. 2000-a;15:230-236.
- López-Serrano MC, Gomez AA, Daschner A, Moreno-Ancillo A, de Parga JM, Caballero MT, *et al*. Gastroallergic anisakiasis: findings in 22 patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000-b;15(5):503-6.
- López-Vélez R, García A, Barros C, Manzarbeitia F, Oñate JM. Anisakiasis en España. Descripción de 3 casos. *Enf Infec Microbiol Clin*. 1992;10:158-161.
- Lopieńska-Biernat E, Zóltowska K, Rokicki J. The activity of hydrolases of larval stages of *Anisakis simplex* (Nematoda). *Wiad Parazytol*. 2004;50(3):503-7.
- Lorenzo S, Iglesias R, Audicana MT, García-Villaescusa R, Pardo F, Sanmartín ML, *et al*. Human immunoglobulin isotype profiles produced in response to antigens recognized by monoclonal antibodies specific to *Anisakis simplex*. *Clin Exp Allergy*. 1999;29(8):1095-101.
- Lorenzo S, Iglesias R, Leiro J, Ubeira FM. Usefulness of currently available methods for the diagnosis of *Anisakis simplex* allergy. *Allergy*. 2000;55:627-633.
- Luo H, Nijveen H. Understanding and identifying amino acid repeats. *Brief Bioinform*. 2014;15:582-91.
- Lustigman S, McKerrow JH, Shah K, Lui J, Huima T, Hough M, *et al*. Cloning of a cysteine protease required for the molting of *Onchocerca volvulus* third stage larvae. *J Biol Chem*. 1996;271:30181-30189.
- Lustigman S, Zhang J, Liu J, Oksov Y, Hashmi S. RNA interference targeting cathepsin L and Z-like cysteine proteases of *Onchocerca volvulus* confirmed their essential function during L3 molting. *Mol Biochem Parasitol*. 2004;138:165-170.

- Machi T, Okino S, Saito Y, Horita Y, Taguchi T, Nakazawa T, *et al.* Severe chest pain due to gastric anisakiasis. *Internal Medicine*. 1997;36:28-30.
- Mahajan B, Noiva R, Yadava A, Zheng H, Majam V, Mohan KV, *et al.* Protein disulfide isomerase assisted protein folding in malaria parasites. *Int J Parasitol*. 2006;36(9):1037-48.
- Maizels RM, Smith KA. Regulatory T cells in infection. *Adv Immunol*. 2011;112:73-136.
- Malagón D, Díaz-López M, Benítez R, Adroher FJ. Cathepsin B- and L-like cysteine protease activities during the in vitro development of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae), a worldwide fish parasite. *Parasitol Int*. 2010;59(1):89-92.
- Marcilla A, Garg G, Bernal D, Ranganathan S, Forment J, Ortiz J, *et al.* The transcriptome analysis of *Strongyloides stercoralis* L3i larvae reveals targets for intervention in a neglected disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(2):e1513.
- Mares RE, Magaña PD, Meléndez-López SG, Licea AF, Cornejo-Bravo JM, Ramos MA. Oxidative folding and reductive activities of EhPDI, a protein disulfide isomerase from *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Int*. 2009;58(3):311-3.
- Marston FA. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem J*. 1986;240:1-12.
- Martínez-Aranguren RM, Gamboa PM, García-Lirio E, Asturias J, Goikoetxea MJ, Larruga MLS. *In vivo* and *in vitro* testing with rAni s 1 can facilitate diagnosis of *Anisakis simplex* Allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2014;24(6):431-438.
- Marzocca G, Rocchi B, Lo Gatto M, Polito S, Varrone F, Caputo E, *et al.* Acute abdomen by anisakiasis and globalization. *Ann Ital Chir*. 2009;80(1):65-8.
- Matsui T, Iida M, Murakami M, Kimura Y, Fujishima M, Yao Y, *et al.* Intestinal anisakiasis: clinical and radiologic features. *Radiology*. 1985;157:299-302.
- Matsumoto T, Iida M, Kimura Y, Tanaka K, Kitada T, Fujishima M. Anisakiasis of the colon: Radiologic and endoscopic features in six patients. *Radiology*. 1985;183:97-9.
- Matsumoto T, Iida M, Kimura Y, Tanaka K, Kitada T, Fujishima M. Anisakiasis of the colon: radiologic and endoscopic features in six patients. *Radiology*. 1992;183:97-99.
- Matsuoka H, Nakama T, Kisanuki H, Uno H, Tachibana N, Tsubouchi H, *et al.* A case report of serologically diagnosed pulmonary anisakiasis with pleural effusion and multiple lesions. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1994;51:819-822.
- Matthews BE. The source, release and specificity of proteolytic enzyme activity produced by *Anisakis simplex* larvae (Nematoda: Ascari- dida) *in vitro*. *J. Helminthol*. 1984;58:175-185.

- Mattiucci S, Paggi L, Nascetti G, Abollo E, Webb SC, Pascual S, *et al.* Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae). *Int J Parasitol.* 2001;31(1):9-14.
- Mattiucci S, Paggi L, Nascetti G, Portes Santos C, Costa G, Di Benedetto AP, *et al.* Genetic markers in the study of *Anisakis typica* (Diesing, 1860): larval identification and genetic relationships with other species of *Anisakis Dujardin, 1845* (Nematoda: Anisakidae). *Syst Parasitol.* 2002;51(3):159-70.
- Mattiucci S, Abaunza P, Ramadori L, Nascetti G. Genetic identification of *Anisakis* larvae in European hake from Atlantic and Mediterranean waters for stock recognition. *J Fish Biol.* 2004;65:495-510.
- Mattiucci S, Nascetti G, Dailey M, Webb SC, Barros NB, Cianchi R, *et al.* Evidence for a new species of *Anisakis Dujardin, 1845*: morphological description and genetic relationships between congeners (Nematoda: Anisakidae). *Syst Parasitol.* 2005;61:157-71.
- Mattiucci S, Nascetti G. Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis Dujardin, 1845*: an update. *Parasite.* 2006;13: 99-113.
- Mattiucci S, Cipriani P, Webb SC, Paoletti M, Marcer F, Bellisario B, *et al.* Genetic and Morphological Approaches Distinguish the Three Sibling Species of the *Anisakis simplex* Species Complex, with a Species Designation as *Anisakis berlandi* n. sp. for *A. simplex* sp. C (Nematoda: Anisakidae). *Journal of Parasitology.* 2014;100(2), 199-214.
- McGibbon AM, Christie JF, Kennedy MW, Lee TD. Identification of the major *Ascaris* allergen and its purification to homogeneity by high-performance liquid chromatography. *Mol Biochem Parasitol.* 1990;39(2):163-71.
- McGibbon AM, Lee TD. Structural characteristics of the *Ascaris* allergen, ABA-1. *Parasite.* 1995;2(1):41-8.
- McSorley HJ, Maizels RM. Helminth infections and host immune regulation. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(4):585-608.
- Meek B, Back JW, Klaren VN, Speijer D, Peek R. Conserved regions of protein disulfide isomerase are targeted by natural IgA antibodies in humans. *Int Immunol.* 2002;14(11):1291-301.
- Meenan NA, Ball G, Bromek K, Uhrin D, Cooper A, Kennedy MW, *et al.* Solution structure of a repeated unit of the ABA-1 nematode polyprotein allergen of *Ascaris* reveals a novel fold and two discrete lipid-binding sites. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(4):e1040.
- Menéndez P, Pardo R, Delgado M, León C. Mesenteric tumor due to chronic anisakiasis. *Rev Esp Enferm Dig.* 2015;107(9):570-2.
- Michel Y, McIntyre M, Ginglinger H, Ollert M, Cifuentes L, Blank S, *et al.* The putative serine protease inhibitor Api m 6 from *Apis mellifera* venom: recombinant and structural evaluation.

- J Investig Allergol Clin Immunol. 2012;22(7):476-84.
- Mineta S, Shimanuki K, Sugiura A, Tsuchiya Y, Kaneko M, Sugiyama Y, *et al.* Chronic anisakiasis of the ascending colon associated with carcinoma. J Nippon Med Sch. 2006;73:169-74.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Informe del consumo de alimentación en España 2015. 2016;78-87.
- Mladineo I, Poljak V, Martínez-Sernández V, Ubeira MF. Anti-*Anisakis* IgE seroprevalence in the healthy Croatian coastal population and associated risk factors. Plos Negl Trop Dis. 2014;8:e2673.
- Mladineo I, Popović M, Drmić-Hofman I, Poljak V. A case report of *Anisakis pegreffii* (Nematoda, Anisakidae) identified from archival paraffin sections of a Croatian patient. BMC Infect Dis. 2016;16(1):42.
- Molehin AJ, Gobert GN, Driguez P, McManus DP. Characterisation of a secretory serine protease inhibitor (SjB6) from *Schistosoma japonicum*. Parasit Vectors. 2014;14:7-330.
- Molina-Fernandez D, Malagón D, Gómez-Mateos M, Benítez R, Martín-Sánchez J, Adroher F. Fishing area and fish size as risk factors of *Anisakis* infection in sardines (*Sardina pilchardus*) from Iberian waters, southwestern Europe. Int. J. Food Microbiol. 2015;203:27-34.
- Moneo I, Puente S, Sánchez Agudo L, Curiel G, Cabal A, Baquero M, *et al.* Estudio de la liberación de histamina en sujetos normales, atópicos y parasitados. Revista Doyma de Inmunología. 1993;12(2):54-58.
- Moneo I, Caballero ML, Gómez F, Ortega E, Alonso MJ. Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. J Allergy Clin Immunol. 2000;106(1 Pt 1):177-182.
- Moneo I, Caballero ML. Las larvas de *Anisakis simplex* incubadas en medio ácido diluido liberan alérgenos que pueden tener utilidad en diagnóstico clínico. Alergol Inmunol Clin. 2002;17:201-7.
- Moneo I, Caballero ML, González-Muñoz M, Rodríguez-Mahillo AI, Rodríguez-Perez R, Silva A. Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. Parasitol Res. 2005;96(5):285-289.
- Moreno-Ancillo A, Caballero MT, Cabañas R, Contreras J, Martín-Barroso JA, Barranco P, *et al.* Allergic reactions to *Anisakis simplex* parasiting seafood. Ann Allergy Asthma Immunol. 1997;79:246-50.
- Morris SR, Sakanari JA. Characterization of the serine protease and serine protease inhibitor from the tissue-penetrating nematode *Anisakis simplex*. J. Biol. Chem. 1994;269:27650-27656.
- Mühlschlegel F, Frosch P, Castro A, Apfel H, Müller A, Frosch M. Molecular cloning and

- characterization of an *Echinococcus multilocularis* and *Echinococcus granulosus* stress protein homologous to the mammalian 78 kDa glucose regulated protein. Mol Biochem Parasitol. 1995;74(2):245-50.
- Muraoka A, Suehiro I, Fujii M, Nagata K, Kusunoki H, Kumon Y, *et al.* Acute gastric anisakiasis: 28 cases during the last 10 years. Dig Dis Sci. 1996;41:2362-5.
- Murray J, Gregory WF, Gomez-Escobar N, Atmadja AK, Maizels RM. Expression and immune recognition of *Brugia malayi* VAL-1, a homologue of vespid venom allergens and *Ancylostoma* secreted proteins. Mol Biochem Parasitol. 2001;118(1):89-96.
- Myhre S, Tveit H, Mollestad T, Laegreid A. Additional gene ontology structure for improved biological reasoning. Bioinformatics. 2006;22(16):2020-2027.
- Nakagawa T, Stadler BM, De Weck AL. Flow-cytometric analysis of human basophil degranulation. I. Quantification of human basophils and their degranulation by flow-cytometry. Allergy. 1981;36:39-47.
- Newlands GF, Skuce PJ, Nisbet AJ, Redmond DL, Smith SK, Pettit D, *et al.* Molecular characterization of a family of metalloendopeptidases from the intestinal brush border of *Haemonchus contortus*. Parasitology. 2006;133(Pt3):357-368.
- Nguyen TT, Qasim MA, Morris S, Lu CC, Hill D, Laskowski Jr M, *et al.* Expression and characterization of elastase inhibitors from the ascarid nematodes *Anisakis simplex* and *Ascaris suum*. Mol Biochem Parasitol. 1999;30(102):79-89.
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Eng. 1997;10(1):1-6
- Nieuwenhuizen N, Lopata AL, Jeebhay MF, Herbert DR, Robins TG, Brombacher F. Exposure to the fish parasite *Anisakis* causes allergic airway hyperreactivity and dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2006;117(5):1098-105.
- Nieuwenhuizen NE, Meter JM, Horsnell WG, Hoving JC, Fick L, Sharp MF, *et al.* A cross-reactive monoclonal antibody to nematode haemoglobin enhances protective immune responses to *Nippostrongylus brasiliensis*. PLoS Negl Trop Dis. 2013;29,7(8):e2395.
- Nieuwenhuizen NE. *Anisakis* - immunology of a foodborne parasitosis. Parasite Immunol. 2016;38(9):548-57.
- Nigam S, Sarma PV, Ghosh PC, Sarma PU. Characterization of *Aspergillus fumigatus* protein disulfide isomerase family gene. Gene. 2001;281(1-2):143-50.
- Ohta M, Ikeda K, Miyakoshi H, Nishide K, Horigami T, Akao T, *et al.* A very rare case of continuous ambulatory peritoneal dialysis peritonitis caused by *Anisakis* larva. Am. J. Gastroenterol. 1995;90:1902-1903.

- Orecchia P, Paggi L, Mattiuc S, Di Cave D, Catalini N. Infestazione da larva di *Anisakis simplex* e *Anisakis physeteris* in specie ittiche dei mari italiani. *Parassitologia*. 1989;31:37-43.
- Park JS, Cho MK, Yu HS, Ahn SC. Identification of a 24 kDa excretory secretory protein in *Anisakis simplex*. *Exp Parasitol*. 2012;130(1):69-72.
- Pascual CY, Crespo JF, San Martin S, Ornia N, Ortega N, Caballero T, Muñoz-Pereira M, Martin-Esteban M. Cross-reactivity between IgE-binding proteins from *Anisakis*, German cockroach, and chironomids. *Allergy*. 1997;52(5):514-20.
- Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85:2444-2448.
- Pekmezci GZ. Occurrence of *Anisakis simplex sensu stricto* in imported Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) represents a risk for Turkish consumers. *Int J Food Microbiol*. 2014;185:64-8.
- Pérez-Pérez J, Fernández-Caldas E, Marañón F, Sastre J, Bernal ML, Rodríguez J, *et al*. Molecular cloning of paramyosin, a new allergen of *Anisakis simplex*. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000;123(2):120-129.
- Petithory JC, Paugam B, Buyet-Rousset P, Paugam A. *Anisakis simplex*, a co-factor of gastric cancer? *Lancet*. 1990;336(8721):1002.
- Petithory JC, Rousseau M, Siodlak F. Seroepidemiological data on anisakiasis: prophylactic consequences in fish products. *Bull Acad Natl Med*. 1991;175(2):273-7; discussion 277-9.
- Plath F, Holle A, Zendeh D, Moller FW, Barten M, Reisinger EC, *et al*. Anisakiasis of the stomach—a case report from Germany. *Z. Gastroenterol*. 2001;39:177-180.
- Picó-Durán G, Pulleiro-Potela L, Abolloc E, Pascual S, Muñoz P. Molecular identification of *Anisakis* and *Hysterothylacium* larvae in commercial cephalopods from the Spanish Mediterranean coast. *Vet Parasitol*. 2016;220:47-53.
- Pomés A, Melén E, Vailes LD, Retief JD, Arruda LK, Chapman MD. Novel allergen structures with tandem amino acid repeats derived from German and American cockroach. *J Biol Chem*. 1998;273(46):30801-7.
- Pomés A. Intrinsic properties of allergens and environmental exposure as determinants of allergenicity. *Allergy*. 2002;57:673-9.
- Pontes T, D'Amelio S, Costa G, Paggi L. Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes of Madeira by a PCR-based approach, with evidence for a new species. *J Parasitol*. 2005;91(6):1430-1434.
- Quiazon KMA, Yoshinaga T, Ogawa K, Yukami R. Morphological differences between larvae and in vitro-cultured adults of *Anisakis simplex* (*sensu stricto*) and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae). *Parasitol Int*. 2008;57:483-489.

- Quiazon KMA, Yoshinaga T, Ogawa K. Experimental challenge of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in rainbow trout and olive flounder. *Parasitology International*. 2011;60(2):126-131.
- Quiazon KM, Zenke K, Yoshinaga T. Molecular characterization and comparison of four *Anisakis* allergens between *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* from Japan. *Mol Biochem Parasitol*. 2013;190(1):23-6.
- Quijada J, Lima dos Santos CA, Avdalov N. Enfermedades parasitarias por consumo de pescado. Incidencia en América Latina. *INFOPESCA Int*. 2005;24:16-23. ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/lisimcope/palestra_nelson_avdalov.pdf
- Radauer C, Bublin M, Wagner S, Mari A, Breiteneder H. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121:847-52 e7.
- Ramanan P, Blumberg AK, Mathison B, Pritt BS. Parametrial anisakidosis. *J Clin Microbiol*. 2013;51:3430-4.
- Redmond DL, Knox DP, Newlands G, Smith WD. Molecular cloning and characterisation of a developmentally regulated putative metallopeptidase present in a host protective extract of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol*. 1997;85(1):77-87.
- Reese G, Ayuso R, Carle T, Lehrer SB. IgE-binding epitopes of shrimp tropomyosin, the major allergen Pen a 1. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999;118(2-4):300-1.
- Repiso A, Alcantara M, Gonzalez C, de Artaza T, Rodriguez R, Valle J, *et al*. Gastrointestinal anisakiasis. Study of a series of 25 patients. *Gastroenterol. Hepatol*. 2003;26:341-346.
- Rios-Steiner JL, Murakami MT, Tulinsky A, Arni RK. Active and exo-site inhibition of human factor Xa: structure of des-Gla factor Xa inhibited by NAP5, a potent nematode anticoagulant protein from *Ancylostoma caninum*. *J Mol Biol*. 2007;371(3):774-86.
- Riu Pons F, Gimeno J, Albero R, Álvarez MA, Dedeu JM, Barranco L, *et al*. An unusual presentation of anisakiasis in the colon (with video). *Gastrointest Endosc*. 2015;81(4):1050-1.
- Robinson MW, Corvo I, Jones PM, George AM, Padula MP, To J, *et al*. Collagenolytic activities of the major secreted cathepsin L peptidases involved in the virulence of the helminth pathogen, *Fasciola hepatica*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(4):e1012.
- Rodero M, Cuéllar C, Chivato T, Jiménez A, Mateos JM, Laguna R. Evaluation by the skin prick test of *Anisakis simplex* antigen purified by affinity chromatography in patients clinically diagnosed with *Anisakis* sensitization. *Journal of Helminthology*. 2004;78(2):159-165.

- Rodríguez E, Anadón AM, García-Bodas E, Romarís F, Iglesias R, Gárate T, *et al.* Novel sequences and epitopes of diagnostic value derived from the *Anisakis simplex* Ani s 7 major allergen. *Allergy*. 2008;63(2):219-225.
- Rodriguez M, de la Cuadra J, Conde L. La técnica del prick-test en la consulta de dermatología. *Rev Piel*. 2004;19(5):276-80.
- Rodríguez-Mahillo AI, González-Muñoz M, Gomez-Aguado F, Rodríguez-Perez R, Corcuera MT, Caballero ML, *et al.* Cloning and characterisation of the *Anisakis simplex* allergen Ani s 4 as a cysteine-protease inhibitor. *Int J Parasitol*. 2007;37(8-9):907-917.
- Rodríguez-Mahillo A, González-Muñoz M, Moneo I. Identification and allergenic characterisation of a new isoform of the *A. simplex* allergen Ani s 4. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2008;160:152-156.
- Rodríguez-Pérez R, Caballero ML, González-Muñoz M, Rodríguez-Mahillo A, Moneo I. Cloning and expression of a biologically active *Anisakis simplex* allergen Ani s 1 in the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Biochem Parasitol*. 2007;154(1):115-8.
- Rodríguez-Pérez R, Moneo I, Rodríguez-Mahillo A, Caballero ML. Cloning and expression of Ani s 9, a new *Anisakis simplex* allergen. *Mol Biochem Parasitol*. 2008;159(2): 92-97.
- Rodríguez-Pérez R, Monsalve RI, Galán A, Perez-Piñar T, Umpierrez A, Lluch-Bernal M, *et al.* Cross-reactivity between *Anisakis* spp. and wasp venom allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014;163(3):179-84.
- Rosales MF, Mascaro C, Fernandez C, Luque F, Sanchez Moreno M, Parras L, *et al.* Acute intestinal anisakiasis in Spain: a fourth-stage *Anisakis simplex* larva. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94:823-6.
- Saito W, Kawakami K, Kuroki R, Matsuo H, Oishi K, Nagatake T. Pulmonary anisakiasis presenting as eosinophilic pleural effusion. *Respirology*. 2005;10:261-262.
- Sakanari JA, Staunton CE, Eakin AE, Craik CS, McKerrow JH. Serine proteases from nematode and protozoan parasites: isolation of sequence homologs using generic molecular probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jul;86(13):4863-7.
- Sakanari JA, McKerrow JH. Identification of the secreted neutral proteases from *Anisakis simplex*. *J Parasitol*. 1990;76:625-630.
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4th edition. New York: Cold Spring Harbor, Laboratory Press, 2001.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-5467.
- Sanmartín ML, Quintero P, Iglesias, Santamaría MT, Leiro J, Ubeira FM. Nematodos parásitos en

peces de las costas gallegas. Ed. Díaz de Santos. 1994. 40-53.

Santiago Hda C, Bennuru S, Ribeiro JMC, Nutman TB. Structural differences between human proteins and aero- and microbial allergens define allergenicity. *PLoS One*. 2012;7:e40552.

Sasaki T, Fukumori D, Matsumoto H, Ohmori H, Yamamoto F. Small bowel obstruction caused by anisakiasis of the small intestine: report of a case. *Surg Today* 2003;33(2):123-125.

Sastre J, Llunch-Bernal M, Fernández-Caldas E, Marañón F, Quirce S, Arrieta I, *et al*. Estudio de provocación oral doble ciego controlada con placebo con larvas de *Anisakis simplex* liofilizadas. *Alergol Inmunol Clin*. 2000;15:225-229.

Scala, Mari A. Allergome: a unifying platform. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M*. 2006;95:29-40.

Schein CH, Ivanciuc O, Braun W. Bioinformatics approaches to classifying allergens and predicting cross-reactivity. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2007;27(1):1-27.

Schulz MH, Zerbino DR, Vingron M, Birney E. Oases: robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. *Bioinformatics*. 2012;28(8):1086-1092.

Schuster R, Petrini JL, Choi R. Anisakiasis of the colon presenting as bowel obstruction. *Am Surg*. 2003;69:350-352.

Sereda MJ, Hartmann S, Lucius R. Helminths and allergy: the example of tropomyosin. *Trends Parasitol*. 2008;24(6):272-8.

Shimakura K, Miura H, Ikeda K, Ishizaki S, Nagashima Y, Shirai T, *et al*. Purification and molecular cloning of a major allergen from *Anisakis simplex*. *Mol Biochem Parasitol*. 2004;135(1):69-75.

Shirahama M, Koga T, Ishibashi H, Uchida S, Ohta Y, Shimoda Y. Intestinal anisakiasis: US in diagnosis. *Radiology* 1992;185(3):789-793.

Shweiki E, Rittenhouse DW, Ochoa JE, Punja VP, Zubair MH, Baliff JP. Acute Small-Bowel Obstruction From Intestinal Anisakiasis After the Ingestion of Raw Clams; Documenting a New Method of Marine-to-Human Parasitic Transmission. *Open Forum Infect Dis*. 2014;1(2):ofu087.

Sohn WM, Na BK, Kim TH, Park TJ. Anisakiasis: Report of 15 Gastric Cases Caused by *Anisakis* Type I Larvae and a Brief Review of Korean Anisakiasis Cases. *Korean J Parasitol*. 2015;53(4):465-70.

Stassens P, Bergum PW, Gansemans Y, Jespers L, Laroche Y, Huang S, *et al*. Anticoagulant repertoire of the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(5):2149-54.

Subpipattana P, Grams R, Vichasri-Grams S. Analysis of a calcium-binding EF-hand protein family in *Fasciola gigantica*. *Exp Parasitol*. 2012;130:364-73.

- Sugano S, Suzuki T, Kagesawa M, Kawafune T, Ohshima Y. Noncardiac chest pain due to acute gastric anisakiasis. *Dig Dis Sci*. 1993;38:1354.
- Sugimachi K, Inokuchi K, Ooiwa T, Fujino T, Ishii Y. Acute gastric anisakiasis. Analysis of 178 cases. *JAMA*. 1985;253:1012-3.
- Sutanto I, Maizels RM, Denham DA. Surface antigens of a filarial nematode: analysis of adult *Brugia pahangi* surface components and their use in monoclonal antibody production. *Mol Biochem Parasitol*. 1985;15(2):203-14.
- Suzuki J, Murata R, Hosaka M, Araki J. Risk factors for human *Anisakis* infection and association between the geographic origins of *Scomber japonicus* and anisakid nematodes. *Int J Food Microbiol*. 2010;137:88-93.
- Takahashi H, Chinuki Y, Tanaka A, Morita E. Laminin γ -1 and collagen α -1 (VI) chain are galactose- α -1,3-galactose-bound allergens in beef. *Allergy*. 2014;69(2):199-207.
- Takekawa Y, Kimura M, Sakakibara M, Yoshii R, Yamashita Y, Kubo A, *et al*. Two cases of parasitic granuloma found incidentally in surgical specimens. *Rinsho Byori*. 2004;52:28-31.
- Telford MJ, Bourlat SJ, Economou A, Papillon D, Rota-Stabelli O. The evolution of the Ecdysozoa. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2008;363(1496):1529-37.
- Testini M, Gentile A, Lissidini G, Di Venere B, Pampiglione S. Splenic anisakiasis resulting from a gastric perforation: an unusual occurrence. *Int. Surg*. 2003;88:126-128.
- Thomas JO, Kornberg RD. The study of histone-histone associations by chemical cross-linking. *Methods Cell Biol*. 1978;18:429-440.
- Thomas WR, Smith WA, Hales BJ, Mills KL, O'Brien RM. Characterization and immunobiology of house dust mite allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;129(1):1-18.
- Tolkatchev D, Ng A, Zhu B, Ni F. Identification of a thrombin-binding region in the sixth epidermal growth factor-like repeat of human thrombomodulin. *Biochemistry*. 2000; 39:10365-72.
- Torres J, Fontán M. Pruebas diagnósticas en Alergología Pediátrica. *Protoc diagn ter pediatr*. 2013;1:185-205.
- Tutar Y. Pseudogenes. *Comp Funct Genomics*. 2012;2012:424526.
- Valdivieso E, Perteguer MJ, Hurtado C, Campioli P, Rodríguez E, Saborido A, *et al*. ANISERP: a new serpin from the parasite *Anisakis simplex*. *Parasites & Vectors*. 2015;8,399.
- Valenzuela JG, Charlab R, Gonzalez EC, de Miranda-Santos IK, Marinotti O, Francischetti IM, Ribeiro JM. The D7 family of salivary proteins in blood sucking diptera. *Insect Mol Biol*. 2002;11(2):149-55.

- Valenzuela JG, Francischetti IM, Pham VM, Garfield MK, Ribeiro JM. Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Biochem Mol Biol*. 2003;33(7):717-32.
- Valero A, Terrados S, Díaz V, Reguera V, Lozano J. Determination of IgE in the serum of patients with allergic reactions to four species of fish-parasite anisakids. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol*. 2003;13:94-99.
- Van Etten RL, Davidson R, Stevis PE, MacArthur H, Moore DL. Covalent structure, disulfide bonding, and identification of reactive surface and active site residues of human prostatic acid phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(4):2313–2319.
- Van Thiel P, Kuipers FC, Roskam RT. A nematode parasitic to herring, causing acute abdominal syndromes in man. *Trop. Geogr Med*. 1960;12:97-113.
- Ventura MT, D'Erasmus M, di Gioia R, Tummolo RA, Buquicchio R. Adverse reaction to specific immunotherapy for house-dust mite in a patient with *Anisakis* allergy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008;22(2):259-60.
- Vervloet D, Nizankowska E, Arnaud A, Senft M, Alazia M, Charpin J. Adverse reactions to suxamethonium and other muscle relaxants under general anesthesia. *J Allergy Clin Immunol*. 1983;71:552-559.
- Vieira C, Muro A, Cordero M, Simón F. A preliminary assessment of the recombinant antigen PLA2 in the diagnosis of human dirofilariosis. *Parasite*. 1997;4(2):193-6.
- Vogt RG, Prestwich GD, Lerner MR. Odorant-binding-protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects. *J Neurobiol*. 1991;22(1):74-84.
- Weinstock GM, Robinson GE, Gibbs RA, Weinstock GM, Robinson GE, Worley KC, *et al*. Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*. 2006;443(7114):931-49.
- Wide L, Bennich H, Johansson SG. Diagnosis of allergy by an in-vitro test for allergen antibodies. *Lancet*. 1967 Nov 25;2(7526):1105-7.
- Williamson AL, Brindley PJ, Abbenante G, Prociv P, Berry C, Girdwood K, *et al*. Cleavage of hemoglobin by hookworm cathepsin D aspartic proteases and its potential contribution to host specificity. *FASEB J*. 2002;16(11):1458-60.
- Williamson AL, Brindley PJ, Loukas A. Hookworm cathepsin D aspartic proteases: contributing roles in the host-specific degradation of serum proteins and skin macromolecules. *Parasitology*. 2003-a;126(2):179-185.
- Williamson AL, Brindley PJ, Abbenante G, Datu BJ, Prociv P, Berry C, *et al*. Hookworm aspartic protease, Na-APR-2, cleaves human hemoglobin and serum proteins in a host-specific fashion. *Journal of Infectious Diseases*. 2003-b;187:484-494.

- Yagi K, Nagasawa K, Ishikura H, Nakagawa A, Sato N, Kikuchi K, *et al.* Female worm *Hysterothylacium aduncum* excreted from human: a case report. *Jpn J. Parasitol.* 1996;45:12-23.
- Yang Y, Wei H, Qin W, Zheng J. Expression and characterization of aspartic protease gene in eggs and larvae stage of *Ancylostoma caninum*. *Parasitol Res.* 2009;104(6):1327-33.
- Yasueda H, Mita H, Yui Y, Shida, T. Comparative analysis of physicochemical and immunochemical properties of the two major allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus* and the corresponding allergens from *Dermatophagoides farinae*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1989;88:402-407.
- Yeum CH, Ma SK, Kim SW, Kim NH, Kim J, Choi KC. Incidental detection of an *Anisakis* larva in continuous ambulatory peritoneal dialysis effluent. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002;17(8):1522-1523.
- Yin J, Madaan U, Park A, Aftab N, Savage-Dunn C. Multiple cis elements and GATA factors regulate a cuticle collagen gene in *Caenorhabditis elegans*. *Genesis.* 2015;53(3-4):278-84.
- Yokogawa M, Yoshimura H. *Anisakis*-like larvae causing eosinophilic granulomata in the stomach of man. *Am J Trop Med Hyg.* 1965;14(5):770-3.
- Yoo HJ, Kim SH, Lee JM, Han JK, Choi BI. The association of anisakiasis in the ascending colon with sigmoid colon cancer: CT colonography findings. *Korean J Radiol.* 2008;9:S56-60.
- Yu JR, Seo M, Kim YW, Oh MH, Sohn WM. A human case of gastric infection by *Pseudoterranova decipiens* larva. *Kor. J. Parasitol.* 2001;39:193-196.
- Yu-bao C, Zhou Y, Weihong S, Guifang M, Yang L, Yungang W. Cloning, expression, and analysis of the group 2 allergen from *Dermatophagoides farinae* from China. *An Acad Bras Cienc.* 2010;82(4):941-51.
- Zahler AM. Alternative splicing in *C. elegans*. *WormBook.* 2005:1-13.
- Zang X, Yazdanbakhsh M, Jiang H, Kanost MR, Maizels RM. A novel serpin expressed by blood-borne microfilariae of the parasitic nematode *Brugia malayi* inhibits human neutrophil serine proteinases. *Blood.* 1999;94:1418-1428.
- Zang X, Maizels RM. Serine proteinase inhibitors from nematodes and the arms race between host and pathogen. *Trends Biochem Sci.* 2001;26:191-197.
- Zóltowska K, Dmitryjuk M, Rokicki J, Lopińska-Biernat E. Hydrolases of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda). *Wiad Parazytol.* 2007;53(2):91-5.
- Zullo A, Hassan C, Scaccianoce G, Lorenzetti R, Campo SM, Morini S. Gastric anisakiasis: do not forget the clinical history! *J. Gastrointestin. Liver Dis.* 2010;19:359.

Anexo I

Secuencia de los exones que conforman al scaffold ASIM_0001402501 obtenida de la base de datos de Sanger

Exones
>ASIM_0001402501-mRNA-1e1exon MLRALFLVVIFSLCE
>ASIM_0001402501-mRNA-1e2exon DVVLQCNVKYGREFCDLGAACSQLTGTAIPQVTMGSSYELPQPIVNCIAS
>ASIM_0001402501-mRNA-1e3exon NYVAMCYARYGNSQCLVWFNACRQISSSDIYELTASERECVTS
>ASIM_0001402501-mRNA-1e4exon KTDVMTLCINRYGTDACNNMVVSCYTLTNIPNPENGTKRQLPEIIINCMFS
>ASIM_0001402501-mRNA-1e5exon IYNPSVIWQCIQKYGSKSKVVEIKCYTSTGSSLSKTPWILAPSLSGCITT
>ASIM_0001402501-mRNA-1e6exon MMNINVNSNVGIMSQCITYGNDFCNQMLSSCSVLTNVPFATVGVGGQQIPTILSSCM AS
>ASIM_0001402501-mRNA-1e7exon MANPSIMWQCVQRFVTTCKTLLGSCFTSTGATLSPQTPWVIPSTILTCITS
>ASIM_0001402501-mRNA-1e8exon MNNQNTGVINPVVPVNPVPGVPVNPVVQINQVVPVNPVVPVPIPNPGGPSNTVDVMSQCT QKYGVNFCNNLGASCSSLTNVAFVVPVPGFQQQLSPMIRSCISY
>ASIM_0001402501-mRNA-1e9exon MISPSVMSQCVAKYGSQFCKNLLANCLSSTGATLPMQSPWQIPPVSSCITS
>ASIM_0001402501-mRNA-1e10exon MAKGTDHNKKDVMATCIQRYGADFCKNMVGSCAALTDVTLTSYGIGSVLPQVIVDCMTS

>ASIM_0001402501-mRNA-1e11exon MSSPSIMWQCVQKYGTEFCKLLQDCSASTGASLSPQAPWLIPSVIAECMAK
>ASIM_0001402501-mRNA-1e12exon MVNGGRQADDTMAICIQKYGIKFCNIIGAACSVLTQVPFFPQLPGTVQQLPSELRACVRS
>ASIM_0001402501-mRNA-1e13exon TQKPNVMTKCVEKYGTEFCSSLLQSCSASTGAILPLREPWKIPHPADIADCMYA
>ASIM_0001402501-mRNA-1e14exon MNPESKEDRGGIMSKCIRRYGDFCKKMLESCSALTQVYDSRNTNYASLPQVLKDCMAS
>ASIM_0001402501-mRNA-1e15exon MDSPSVMFECVQRYGTPFCKGLLETCTEKTRASLSPQAPWLIPTAIAQCMRQ
>ASIM_0001402501-mRNA-1e16exon MNQGDEKKTLMSCVRRYGADYCNLAAACSVLTNLPFFPQTPPSEQNLPPMMHKCLKS
>ASIM_0001402501-mRNA-1e17exon MENPGIMSTCVQRYGTQFCKNLLNSCTASTGRHLPYDAPWKIPEPIAACMAQ
>ASIM_0001402501-mRNA-1e18exon MNGGDHKKEDAMARCIRKYGVTYCNMMLASCSVLTNVNYDPSGGQMPGILSECVTAGK NLRKLIQTSID
>ASIM_0001402501-mRNA-1e19exon FGLRSVSETDEPSAMCQCQVQKYGTEFCKKRLASCIASGMNLPATTPWKLPPPVARCMQH
>ASIM_0001402501-mRNA-1e20exon SPNDNRGQGQGSNDVMSQCIARYGAFCQRLARFCYAMNSLQYPGETFDPQQQTPTQV ARCMKS
>ASIM_0001402501-mRNA-1e21exon MDSPSVMWHCVQKYGQEFCKNLAATCSTETNTPLPQQDPWRLPQPIIACMLG
>ASIM_0001402501-mRNA-1e22exon MNNPNPTSKPQSVMSQCTARYGDDFCLSLGKACAELNNVPSSMISLSAQQLPQPVSCKM A

>ASIM_0001402501-mRNA-1e23exon MNNPSAMWLCIQKYGIEFCNRLASACAMIKKVTMPTVTINLPEIIASCVAS
>ASIM_0001402501-mRNA-1e24exon NSQAMCYARKGPEQCKTEENICRNPNNPPGSPLTIPETECMKS
>ASIM_0001402501-mRNA-1.e25exon VAMATCQKKFGSECVALQQECVAGTGAPPVTIGARGAFMLATALRS
>ASIM_0001402501-mRNA-1e26exon GVIGSCVLYHPPSQCDQWVQQCATALQTSAGVTVAGGYRQLSPPMAICVAS
>ASIM_0001402501-mRNA-1e27exon DLMTRCMTLRLGQGTCQQAQVKNCKRRFNTTPSSRLPGRLWSLSSELINCLYRPVNRASN- LPSSNCIPIISCSIHLSVCHSFVHN-MKYGLS-VKVAADSSYLNSSQNIRNFKLY-TDMLIC- IALPSPN-TPNS-INR

Secuencia del scaffold ASIM_0001402501 obtenida de la base de datos de Sanger

>ASIM_0001402501

MLRALFLVVFSLCEGDVVLQCNVKGREFCDRLGAACSQLTGTAIPQVTMGSSYELPQPIVNCIASENYVAMC
YARYGNSQCLVWFNACRQISSSDIYELTASERECVTSQKTDVMTLCINRYGTDACNNMVVSCYTTLNIPNPEN
GTRQLPEIIINCMFSEIYNPSVIWQCIQKYGSKCKVIEKCYTSTGSSLSKKTWPILAPSLSGCITTGMMNINVN
SNVGIMSQCITTYGNDFCNQMLSSCSVLTNVPFATVGVGGQQQIPTILSSCMASEMANPSIMWQCVQRFQV
TTCKTLLGSCFTSTGATLSPQTPWVIPSTILTITSGMNNQNTGVINPVVPVNPVNPVQINQVVPVNPV
PVIPINPGGPSNTVDVMSQCTQKYGVNFCNNLGASCSSLTNVAFVVPVPGFGGQQQLSPMIRSCISYEMISPSVMS
QCVAKYGSQFCKNLLANCLSTGATLPMQSPWQIPVSSCITSGMAKGTDNKKDVMATCIQRYGADFCNK
MVGSCAALTDVTLTSYGIGSVLPQVIVDCMTSEMSSPSIMWQCVQKYGTEFCKLLQDCSASTGASLSPQAP
WLIPSVIAECMAKGMVNGGRQADDTMAICIQKYGIKFCNIIGAACSVLTQVPFFPQLPGTVQQLPSELACVRS
ETQKPNVMTKCKVEKYGTEFCSSLLQSCSASTGAILPLREPWKIPHIADCMYAGMNPESKEDRGGIMSKCIRRY
GDFDCKKMLESCSALTSVQYDSRNTNYASLPQVLKDCMASEMDSPSVMFECVQRYGTPFCKGLLETCTEKTRA
SLSPQAPWLIPTAIAQCMRQGMNQGDCKTLMSLCVRRYGADYCNNLAAACSVLTNLPPFPQTPPSEQNLPP
MMHKCLKSEMENPGIMSTCVQRYGTQFCKNLLNSCTASTGRHLPYDAPWKIPEPIAACMAQGMNGGDHKP
KEDAMARCIRKYGVTYCNMMLASCSVLTNVNYDPSGGQMPGILSECVTAGKNLRKLIQTSIDWFLRSVSETD
EPSAMCQCQVQKYGTEFCKKRLASCIASCTGMNLPATTPWKLPPVARCMQHGSPNDNRGQGQGSNDVMSQ
CIARYGAFCQRLARFCYAMNSLQYPGETFDPQQQTPTQVARCMKSEMDSPSVMWHCVQKYGQEFCKLA
ATCSTETNTPLPQQDPWRLPQPIACMLGKMNNPNPTSKPQSVMSQCTARYGDDFCLSLGKACAELNNVPSS
MISLSAQQLPQPVSSCMKAEMNNPSAMWLCIQKYGIEFCNRLASACAMIKKVTMPTVTINLPEIIASCVASENS
QAMCYARKGPEQCKTEENICRNPNNPPGSPLTIPETECMKSQVAMATCQKKFGSECVALQQECVAGTGAPP
VTIGARGAFMLATALRS.GVIGSCVLYHPPSQCDQWVQQCATALQTSAGVTVAGGYRQLSPPMAICVASDLM
TRCMTLRLGQGTCQQAQVKNCKRRFNTTPSSRLPGRLWSLSSELINCLYRPVNRASN

Anexo II

Secuencias correspondientes a fragmentos clonados del gen completo de Ani s 7.

Fragmentos	Secuencias
D1R1_4	1 MLRALFLVVIFSLCEGDVVLQCNVKYGREFCDRLGAACSQLTGTAIPQVTMGSSYELPQP 60 61 IVNCIASENYVAMCYARYGNSQCLVWFNACRQISSSDIYELTASERECVTSRMMNINVNS 120 121 NVGIMSQCITTYGNDFCNQMLSSCSVLTNVPFATVGVGGQQIIPITLSSCMASEMANPSI 180 181 MGQCVQRFVGTCTKLLGSCFTSTGATLSPQTPWVIPSTILTCTITSGMNNQNTGVINPVV 240 241 PVNPGVPVNPVVQINQVVPVNPVVPVPIPNPGGPSNTVDVMSH 283
D1R1_5	1 MLRALFLVVIFSLCEGDVVLQCNVKYGREFCDRLGAACSQLTGTAIPQVTMGSSYELPQP 60 61 IVNCIASENYVAMCYARYGNSQCLVWFNACRQISSSDIYELTASERECVTSRMMNINVNS 120 121 NVGIMSQCITTYGNDFCNQMLSSCSVLTNVPFATVGVGGQQIIPITLSSCMASEMANPSI 180 181 MGQCVQRFVGTCTKLLGSCFTSTGATLSPQTPWVIPSTILTCTITSGMNNQNTGVINPVV 240 241 PVNPGVPVNPVVQINQVVPVNPVVPVPIPNPGGPSNTVDVMSH 283
D1R1_7	1 MLRALFLVVIFSLCEGDVVLQCNVKYGREFCDRLGAACSQLTGTAIPQVTMGSSYELPQP 60 61 IVNCIASENYVAMCYARYGNSQCLVWFNACRQISSSDIYELTASERECVTSRMMNINVNS 120 121 NVGIMSQCITTYGNDFCNQMLSSCSVLTNVPFATVGVGGQQIIPITLSSCMASEMANPSI 180 181 MWQCVQRFVGTCTKLLGSCFTSTGATLSPQTPWVIPSTILTCTITSGMNNQNTGVINPVV 240 241 PVNPGVPVNPVLVQINQLVPVNPVVPVPIPNQGGPSNTVDVMS 282
D1R1_mayor_3	1 MLRALFLVVIFSLCEGDVVLQCNVKYGREFCDRLGAACSQLTGTAIPQVTMGSSYELPQP 60 61 IVNCIASENYVAMCYARYGNSQCLVWFNACRQISSSDIYELTASERECVTSRMMNINVNS 120 121 RCSSSPNLPFCANLKTVCQYLGPNQSEKTDVMTLCINRYGTDACNNTVVSCYTLTNIPN 180 181 PENGTRQLPEIIINCMESEIYNPSVIWQCIQKYGSKCKVIEKCYTSTGSSLSKKTTPW 240 241 ILAPSLSGCIKTGMNNINVNSNVGIMSQCITTYGNDFCNQMLSSCSVLTNVPFATVGVGG 300 301 QQQIPTILSSCMASEMANPSIMWQCVQRFVGTCTKLLGSRFTSTGATLSPQTPWVIPST 360 361 ILTCTITSGMNNQNTRVINPVVNPVNPVNPVLPVQINQLVPVNPVVPVPIPNQGGPSNTVD 420 421 VMSQ 424
D1R1_mayor_4	1 MLRALFLVVIFSLCEGDVVLQCNVKYGREFCDRLGAACSQLTGTAIPQVTMGSSYELPQP 60 61 IVNCIASENYVAMCYARYGNSQCLVWFNACRQISSSDIYELTASERECVTSRMMNINVNS 120 121 RCSSSPNLPFCANLKTVCQYLGPNQSEKTDVMTLCINRYGTDACNNTVVSCYTLTNIPN 180 181 PENGTRQLPEIIINCMESEIYNPSVIWQCIQKYGSKCKVIEKCYTSTGSSLSKKTTPW 240 241 ILAPSLSGCIKTGMNNINVNSNVGIMSQCITTYGNDFCNQMLSSCSVLTNVPFATVGVGG 300 301 QQQIPTILSSCMASEMANPSIMWQCVQRFVGTCTKLLGSRFTSTGATLSPQTPWVIPST 360 361 ILTCTITSGMNNQNTRVINPVVNPVNPVNPVLPVQINQLVPVNPVVPVPIPNQGGPSNTVD 420 421 VMSQ 424
D2R2_2	1 MNNQNTGVINPVVNPVNPVNPVQINQLVPVNPVVPVPIPNPGGPSNTVDVMSQCTQK 60 61 YGVNFCNNLGASCSLNTNVAFFVPGFGGQQLSPMIRSCISYEMISPSVMSQCVAKYGSQF 120 121 CKNLLANCLSSGTGLPMQSPWQIPPVVSSCITSGMAKGTDHKKDVMATCIQRYGADFC 180 181 KNMVGSCAALTDVTLTSYGIGSVLPQVIVDCMTSEMSSPSIMWQCVQKYGTEFCCKLLQD 240 241 CSASTGASLSPQAPWLIPSVIAECMAKGMVNGGRQADDTMAICIQKYGIKFCNIIIGAACS 300 301 VLTQVFFFPQLPGTVQQLPSELACVRSETQKPNVMTKCEKYGTEFCSSLLQSCSASTG 360 361 AILPLREPWKIPHPADIADCMYAGMNPESKEDRGGIMSK 397
D2R2_3	1 NNQNTGVINPVVNPVNPVNPVQINQLVPVNPVVPVPIPNPGGPSNTVDVMSQCTQKY 60 61 GVNFCNNLGASCSLNTNVAFFVPGFGGQQLSPMIRSCISYEMISPSVMSQCVAKYGSQF 120 121 KNLLANCLSSGTGLPMQSPWQIPPVVSSCITSGMAKGTDHKKDVMATCIQRYGADFC 180 181 NMVGSCAALTDVTLTSYGIGSVLPQVIVDCMTSEMSSPSIMWQCVQKYGTEFCCKLLQD 240 241 SASTGASLSPQAPWLIPSVIAECMAKGMVNGGRQADDTMAICIQKYGIKFCNIIIGAACSV 300 301 LTQVFFFPQLPGTVQQLPSELACVRSETQKPNVMTKCEKYGTEFCSSLLQSCSASTGA 360 361 ILPLREPWKIPHPADIADCMYAGMNPESKEDRGGIMSK 396
D2R2_5	1 NNQNTGVINPVVNPVNPVNPVQINQLVPVNPVVPVPIPNPGGPSNTVDVMSQCTQKY 60 61 GVNFCNNLGASCSLNTNVAFFVPGFGGQQLSPMIRSCISYEMISPSVMSQCVAKYGSQF 120 121 KNLLXNCLSSGTGLPMQSPWQIPPVVSSCITSGMAKGTDHKKDVMATCIQRYGADFC 180 181 NMVGSCAALTDVTLTSYGIGSVLPQVIVDCMTSEMSSPSIMWQCVQKYGTEFCCKLLQD 240 241 SASTGASLSPQAPWLIPSVIAECMAKGMVNGGRQADDTMAICIQKYGIKFCNIIIGAACSV 300 301 LTQVFFFPQLPGTVQQLPSELACVRSETQKPNVMTKCEKYGTEFCSSLLQSCSASTGA 360 361 ILPLREPWKIPHPADIADCMYAGMNPESKEDRGGIMSK 396
D3R3_4	1 SPQAPWLIPSVITECMAKGMVNGGRQADDTMAICIQKYGIKFCNIIIGAACSVLTQVFFFP 60 61 QLPGTVQQLPSELACVRSETQKPNVMTKCEKYGTEFCSSLLQSCSASTGAILPLREPW 120 121 KIPHPADIADCMYAGMNPESSEDRGGIMSKICIRRYGDFCKKMLESCALTSVQHDNRNTNY 180 181 ASLPQVLKDCMASEMDSVSMFEQVQRYGTSFCKGLLETCETKTRASLSPQAPWLIPAI 240 241 AQCMRQGMNQGDEKKTLSLVCVRRYGADYCNLLAAACSVLTNLPFFPQTPPSEQNLPPMM 300 301 HKC 303

Glosario de términos

Alergeno: sustancia capaz de inducir una respuesta alérgica en personas susceptibles.

Anisakidosis: infección parasitaria provocada por los miembros de la familia Anisakidae como *Anisakis* spp., *Pseudoterranova* spp., *Contracaecum* spp. e *Hysterothylacium* spp.

Anisakiosis: enfermedad causada por las especies del género *Anisakis*.

Anotación: proceso de identificación de los genes y otras regiones codificantes o no en la secuencia de ADN, utilizando diferentes softwares, cuyo fundamento se basa en predicción y/o en evidencia biológica.

Antígeno: cualquier sustancia capaz de provocar una respuesta inmunitaria.

Base calling: proceso de asignar bases a picos de un cromatograma. Las bases son: adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T).

Cobertura: porcentaje de bases de un genoma, exoma o transcriptoma que es secuenciado a una profundidad x. Ej. Un genoma puede ser secuenciado el 95% de su secuencia a un 30x en media.

Contenido en GC (G+C): es el porcentaje GC (guanina y citosina) característico del genoma de un organismo o de cualquier fragmento de ADN o ARN.

Contig: algunos autores lo traducen como cóntigo, o derivado de contiguo en español. El *contig* son segmentos de ADN superpuestos, que juntos representan una región consenso de ADN.

CUFFxx: identificador o nombre único asignado a los transcritos obtenidos tras la realización del ensamblado 2 del transcriptoma MH de *A. simplex* s.l.

E-value: conocida en español como e-valor, es la probabilidad de que el alineamiento entre la secuencia a consultar y la de referencia se deba al azar. Cuanto más cerca de 0 sea el valor más probable es que no sea por azar, oscilando entre 0 y cualquier valor. El valor depende del número de secuencias incluidas en la base de datos y de la longitud de la secuencia a consultar

Ensamblaje: el ensamblaje de secuencias se refiere al alineamiento y ordenamiento de múltiples fragmentos de una secuencia de ADN mucho mayor para reconstruir la secuencia original. Se utilizan distintos algoritmos para el ensamblaje de secuencias, desde la obtención de *contigs* al montado de *scaffolds*.

Ensamblaje de transcriptoma “de novo”: construcción de transcriptoma sin un genoma de referencia.

Epitopos: porción de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmunitario, específicamente la secuencia a la que se une los anticuerpos. Pueden ser conformacionales o lineales.

Espectrofotometría de masas (MS): herramienta analítica que suministra información sobre la estructura de especies moleculares complejas, las relaciones isotópicas de los átomos en las muestras, y la composición cualitativa y cuantitativa de los analitos de la muestra.

Extracto crudo: mezcla compleja de proteínas obtenida mediante la ruptura de un organismo completo, o partes del mismo, sometida a centrifugación para separar la fracción soluble. A veces el procesamiento se realiza en presencia de un detergente.

Fastq: es un fichero en texto plano que contiene las secuencias o lecturas generadas por el secuenciador. El archivo contiene la información de la secuencia biológica junto con las calidades phred asociadas a cada nucleótido de dicha secuencia.

Hits: correspondencias encontradas en la búsqueda de secuencias similares.

Huella peptídica: o PMF (del inglés *Peptide mass fingerprinting*), es una técnica analítica de identificación de proteínas mediante espectrometría de masas, del conjunto de fragmentos peptídicos generados tras tratar una proteína concreta con una proteasa determinada.

Isoformas: es una de las distintas formas de la misma proteína. Las distintas formas de una proteína podrían ser generadas por genes relacionados, o podrían generarse por el mismo gen a través del proceso de splicing alternativo, o maduración diferencial del ARNm.

Lecturas (read): secuencia de nucleótidos o bases obtenidas mediante la secuenciación de fragmentos de ADN.

Lecturas pareadas: son lecturas que pertenecen al mismo fragmento de ADN secuenciado, siendo su orientación opuesta, una en sentido forward y otra reverse.

-like: sufijo utilizado en el presente trabajo para indicar que una proteína tiene características similares a una familia de proteínas conocida.

Mapear: localización de las lecturas en la secuencia de referencia.

MS/MS: espectrometría de masas en tándem.

Panalergeno: antígenos responsables de la reactividad cruzada entre especies que no se relacionan de forma directa entre sí.

PCR de puente: amplificación en fase sólida de fragmentos de ADN que tienen ligados la secuencia de un adaptador en sus extremos. La secuencia complementaria de los adaptadores se encuentra unida covalentemente a la fase sólida; el ADN se une a ellos formando un puente de ADN. Tras la desnaturalización y amplificación, se obtienen millones de copias de cada fragmento de ADN molde que pueden ser secuenciados.

PCR *touchdown*: PCR empleada cuando no se conoce exactamente el grado de complementariedad entre ADN molde y cebador, o resulta complicado el cálculo de la temperatura de anillamiento óptima (cebadores degenerados). En este tipo de PCR, la temperatura de anillamiento se reduce gradualmente hasta alcanzar la temperatura de anillamiento de los cebadores, que se mantiene en los últimos ciclos.

Péptidos *matched*: péptidos obtenidos tras digestión enzimática que coinciden con una secuencia de proteína descrita.

***Peptide Score*:** puntuación obtenida de los péptidos *matched*. Cuanto mayor sea este valor, mayor es la probabilidad de una identificación correcta.

Profundidad media de cobertura: número medio de lecturas de cada nucleótido en la secuencia ensamblada.

Reactividad cruzada: reconocimiento de distintos antígenos por una misma inmunoglobulina.

***RNA-seq*:** tecnologías de secuenciación de alto rendimiento de moléculas de ARN con el fin de determinar la secuencia primaria y abundancia relativa de cada ARN.

***Scaffold* o *supercontig*:** grupo de cóntigos (*contigs*) unidos, que rinden secuencias de mayor tamaño en la que puede haber discontinuidades o secuencias ambiguas.

Secuenciación masiva (también denominada *Next-Generation Sequencing*): es una tecnología de secuenciación de ADN de alto rendimiento, capaz de leer múltiples fragmentos de ADN de forma paralela, produciendo millones de secuencias al mismo tiempo, gracias a la incorporación de la nanotecnología, siendo su coste dependiente de plataforma de secuenciación, con una tendencia significativamente a la baja. Gracias a la secuenciación masiva se puede secuenciar, en lugar de un gen, múltiples genes o incluso un genoma completo. Las ventajas de la secuenciación masiva frente a la secuenciación convencional residen en la amplitud del análisis, necesidad de una menor cantidad de material genético, un menor coste y una mayor rapidez.

Secuenciación pareada: es la secuenciación de un fragmento de ADN por ambos extremos, en sentido forward y reverse.

Secuencias homólogas: son secuencias que muestran alta similitud debido a que presentan un mismo origen evolutivo.

Secuencias ortólogas: las secuencias o genes ortólogos son aquellas secuencias homólogas por pertenecer a dos especies que tienen un antepasado común. Es decir, cuando una especie diverge en dos especies separadas, hay un evento de especiación, se dice que las copias divergentes de un

mismo gen en las especies resultantes son ortólogas. Se tratan de secuencias que son altamente similares debido a que se han originado en un antepasado común.

Secuencias parálogas: son secuencias homólogas que se generan por un evento de duplicación. En otras palabras, si un gen de un organismo se duplica para ocupar dos posiciones diferentes en el mismo genoma, entonces las dos copias son parálogas. Típicamente tienen la misma función, o similar; no obstante, en ocasiones debido a que no existe la misma fuerza selectiva original sobre la copia duplicada del gen, ésta puede adquirir nuevas funciones por mutación y por selección.

Sequon: sitio de unión a carbohidratos formado por varios aminoácidos (Asn-Xaa-Ser/Thr) de una proteína.

Splicing alternativo: se conoce como empalme alternativo, o proceso de maduración del ARNm, en el que los intrones del ARNm precursor (pre-ARNm) se eliminan y los exones se ligan para formar el ARN maduro. A partir de este proceso se pueden producir distintas formas de una proteína a partir de un mismo ARN precursor.

Spot: manchas correspondientes a proteínas en un gel de poliacrilamida tras su fraccionamiento por electroforesis bidimensional.

Términos GO (Gene Ontology): es un proyecto que provee un vocabulario controlado que describe el gen y los atributos del producto génico en cualquier organismo. Se divide en: (I) Ontología que define la función molecular de los productos génicos; su rol en los procesos biológicos de múltiples direcciones; y su localización en componentes celulares, (II) Anotación, o caracterización de los productos génicos usando términos de la ontología.

UA3: anticuerpo monoclonal IgG1/kappa que reconoce el alergeno principal de *A. simplex* s.l. Anis 7.